

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. November 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/103077 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/525**,
C12N 15/62, 15/63, A61K 38/19

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **UNIVERSITÄT STUTTGART** [DE/DE];
70049 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/003158

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. März 2005 (24.03.2005)

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PFIZENMAIER, Klaus** [DE/DE]; Seehausstrasse 7, 75233 Tiefenbronn (DE). **SCHEURICH, Peter** [DE/DE]; Marsweg 4, 70565 Stuttgart (DE). **GRUNWALD, Ingo** [DE/DE]; Riekestrasse 15, 28359 Bremen (DE). **KRIPPNER-HEIDENREICH, Anja** [DE/DE]; Friedrich Schaal Strasse 22, 72074 Stuttgart (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

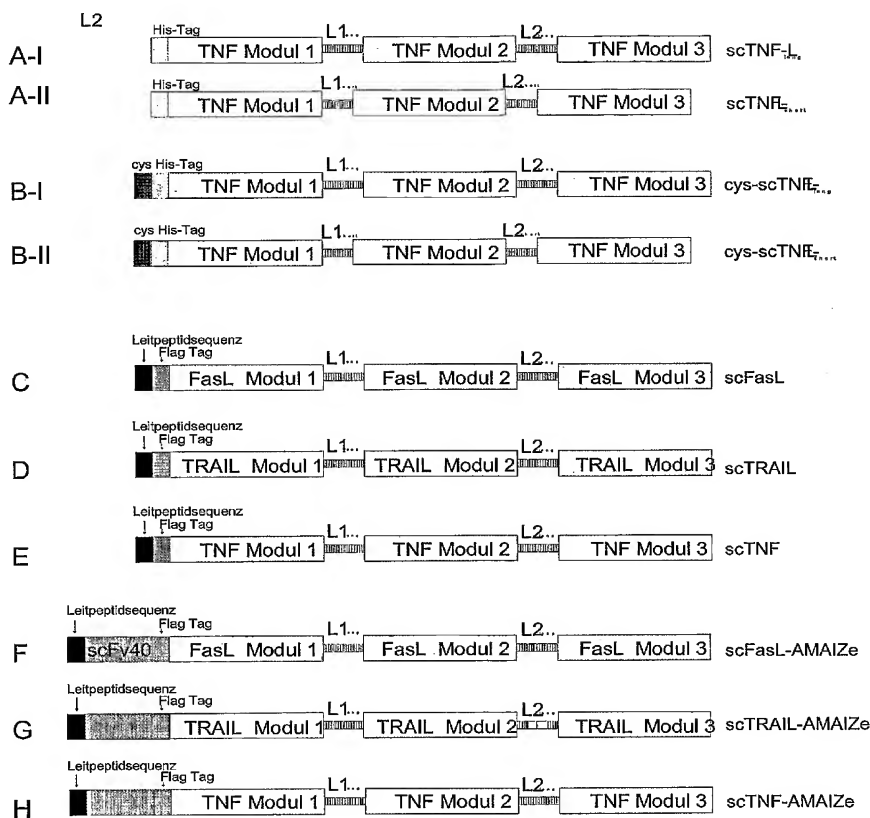
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 014 983.6 26. März 2004 (26.03.2004) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: RECOMBINANT POLYPEPTIDES OF THE MEMBERS OF THE TNF LIGAND FAMILY AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE POLYPEPTIDE DER MITGLIEDER DER TNF LIGANDENFAMILIE UND DEREN VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to polypeptides comprising, as constituent A, at least three monomers of a member of the TNF ligand family and, as constituent B, at least two peptide linkers that link the monomers of the member of the TNF ligand family to one another. The invention also relates to the use of these polypeptides for treating diseases and for producing a medicament or a vaccine. The invention also relates to methods for producing and isolating these polypeptides, to nucleic acids that code for these polypeptides, to vectors containing these nucleic acids, to host cells transfected with these vectors, and to pharmaceutical compositions containing these inventive objects. Finally, the invention relates to methods for the extracorporeal manipulation, depletion and/or removal of components contained in body fluids, e.g. by means of apheresis.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/103077 A1



(74) **Anwälte:** GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch Graf von Stosch Jehle Patentanwaltsgesellschaft MBH, Flüggenstr. 13, 80639 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, welche mindestens drei Monomere eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie als Komponenten A und mindestens zwei Peptid-Linker als Komponenten B umfassen, wobei die Peptid-Linker die Monomere des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie miteinander verknüpfen. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieser Polypeptide zur Behandlung von Erkrankungen, zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Vakzine. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung und Isolierung dieser Polypeptide sowie für die Polypeptide codierende Nukleinsäuren, diese enthaltende Vektoren, mit diesem transfizierte Wirtszellen und pharmazeutische Zusammensetzungen, welche diese genannten Erfindungsgegenstände enthalten. Schliesslich betrifft die Erfindung Verfahren zur extrakorporalen Manipulation, Depletion und/oder Entfernung von in Körperflüssigkeiten enthaltenen Bestandteilen, z.B. mittels Apherese.

Anmelder:

Universität Stuttgart

70049 Stuttgart

**Rekombinante Polypeptide der Mitglieder der TNF Ligandenfamilie
und deren Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, welche mindestens drei Monomere eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie als Komponente A und mindestens zwei Peptid-Linker als Komponenten B umfassen, wobei die Peptid-Linker die Monomere des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie miteinander verknüpfen. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieser Polypeptide zur Behandlung von Erkrankungen, zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Vakzine. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung und Isolierung dieser Polypeptide sowie für die Polypeptide codierende Nukleinsäuren, diese enthaltende Vektoren, mit diesen transfizierte Wirtszellen und pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die genannten Erfindungsgegenstände enthalten. Schließlich betrifft die Erfindung Verfahren zur extrakorporalen Manipulation, Depletion und/oder Entfernung von in Körperflüssigkeiten enthaltenen Bestandteilen, z.B. mittels Apherese.

Bei den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie handelt es sich um proinflammatorische Zytokine. Zytokine im allgemeinen und insbesondere die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie spielen eine wichtige Rolle bei der Stimulation und Koordination des angeborenen Immunsystems sowie der humoralen (Antikörper-vermittelten) Immunantwort, der Induktion von Apoptose, dem Aufbau von Knochen, der Ausbildung der Anlagen für Haarwuchs, Zahnwuchs und Schweißdrüsenentwicklung, der Anlage von Lymphknoten und vielem mehr (Aggarwal, B.B. (2003), Nat. Rev. Immunol. 3, 745-756). Eine fehlerhafte Regulierung von Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie kann dagegen zu zahlreichen pathologischen Zuständen

führen. Hierzu gehört bspw. der septische Schock, Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, oder neurodegenerative Erkrankungen. Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) ist das namensgebende und wohl wichtigste Mitglied dieser großen Zytokinfamilie.

5 Ihre Wirkung entfalten die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie in ihrer biologisch aktiven Form als Homotrimere (Banner, D.W. et al., (1993) Cell 73, 431-445). Trimere Strukturen und auch Aggregationen höherer Ordnung (z.B. Oligo- oder Multimere von Trimeren) von Proteinen sind in der Natur zahlreich anzutreffen. Beispiele sind das Cartilage Matrix Protein (CMP), ein Bindegewebsprotein (Beck et al. (1996), J Mol Biol 256, 909-923), Proteine aus
10 der Kollagenfamilie, wie die Clq-Familie, zu der Clq, Kollagen $\alpha 1$ (X), $\alpha 2$ (VII), das Überwinterungsprotein, ACRP30, das innere Ohrstrukturprotein, Cellerbrin und Multimerin gehören (Kishore und Reid, (1999), Immunopharmacol. 42, 15-21), und Proteine der Collectin-Familie, wie das Lung Surfactant Protein A (SP-A) und das Mannose-Bindungsprotein (MBP) (Epstein et al. (1996), Current Opinion in Immunology, Vol 8 Nr.1, 29-35).

15

Die Zusammenlagerung von Proteinen zu einem Trimer erfolgt an den Oberflächen dieser in Lösung trimerisierenden Proteine aufgrund von Wechselwirkungen, wie hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, kovalenten Bindungen (z.B. Disulfidbrücken), und/oder Coulomb-Kräften, aber auch aufgrund von Strukturmotiven, d.h. charakteristischen Aminosäuresequenzen, die eine Formation von intermolekularen Supersekundärstrukturen bewirken. Bei den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie werden die drei Monomere in der homotrimeren Struktur nicht-kovalent über hydrophobe Bindungen zusammengehalten. In ihrer aktivierten Form aktivieren sie wiederum ihnen gegenüberstehende Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie, die als solche keine enzymatische Aktivität besitzen. Beispielsweise
20 bindet TNF als ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie an die zwei Membranrezeptoren TNFR1 und TNFR2 und vermittelt die Trimerisierung bzw. die Aktivierung bereits trimervorliegender, aber Signal-inaktiver Rezeptoren. Durch die Komplexbildung der Rezeptoren wird eine Signalkaskade eingeleitet, mit der u.a. eine Assoziation zytoplasmatischer Adapterproteine einhergeht (Wajant, H. et al (2003), Cell Death, Differ, 10, 45-65). Die trimere Struktur von TNFR1 und TNFR2 stellt sich derart dar, daß die Rezeptoren jeweils im Zwischenraum zwischen zwei der drei TNF-Monomere des TNF-Homotrimers binden (Banner et al.
30

(1993) *supra*). Hieraus wird deutlich, dass sowohl TNF als auch die anderen Mitglieder der TNF Ligandenfamilie nur in seiner/ihrer Struktur als Homotrimer biologisch aktiv ist/sind.

Aufgrund ihrer Funktion können die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie bzw. deren Membranrezeptoren mannigfaltig zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen, wie Infektions- und Endzündungskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Erkrankungen, die in einer fehlerhaften Regulierung der Apoptose begründet sind, neurodegenerative Erkrankungen und vielen weiteren Erkrankungen, eingesetzt werden. Eine besonders wichtige Rolle spielt ihr Einsatz bei der Behandlung von Krebserkrankungen, da es sich bei den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie generell um antitumoral wirkende Substanzen handelt. Insbesondere zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang TNF selbst (Eggermont, A.M. and ten Hagen, T.L. (2003), Curr. Oncol. Rep. 5, 79-80), TRAIL (TNF related apoptoses inducing ligand), auch Apo 2L genannt (Weley et al. (1995), Immunity 6: 673-682; Petti et al. (1996) J Biol Chem 271: 12687-12689) und FasL. *In vivo* Untersuchungen zeigten jedoch starke systemische Nebenwirkungen bei TNF und Agonisten des Fas Rezeptors und *in vitro* Untersuchungen deuten auch auf ähnliche toxische Wirkungen bei bestimmten TRAIL Präparaten hin (Jo et al. (2000) Nat Med 6: 564-567, Ichikawa et al. (2001) Nat Med 7: 954-960; Ogasawara et al. (1993) Nature 364: 806-809). Beispielsweise zeigten agonistische Antikörper gegen Fas, den Rezeptor von FasL, eine extrem hepatoxische Wirkung (Ogasawara et al. (1993) *supra*). Im Falle von Fas aktivierenden Liganden/Agonisten wurde deshalb eine klinische Anwendung aus Sicherheitsgründen bisher ausgeschlossen. Aufgrund der großen Bedeutung von TNF, TRAIL, FasL und anderer TNF-Ligandenfamilienmitgliedern auf diesem Gebiet und der mit ihrer Applikation in Form einer klinischen systemischen Verabreichung einhergehenden Nebenwirkungen wurden allerdings mehrere Ansätze verfolgt, diese Nebenwirkungen zu minimieren. (Eggermont, A.M. and ten Hagen, T.L. (2003), Curr. Oncol. Rep. 5, 79-80).

So beschreibt beispielsweise WO 02/22680 Fusionsproteine, die eine gerichtete und gewebs- bzw. zellspezifische Wirkung von Zytokinen durch die Fusion des Zytokins mit einem Antigen-bindenden Antikörper ermöglichen. Auf diese Weise wird erreicht, dass die Zytokine auf Gewebe bzw. Zellen, die mit diesen Fusionsproteinen nicht in Kontakt kommen, keine Wirkung entfalten und dass Nebenwirkungen auf diese Gewebe oder Zellen verringert werden.

In der DE 102 47 755 wird ein Antikörper-unabhängiges System offenbart, welches ebenfalls eine gerichtete und gewebs- bzw. zellspezifische Wirkung der Zytokine ermöglicht. Es handelt sich hier um Fusionsproteine, bei denen die Aktivierung eines darin enthaltenen Proteinabschnitts mit biologischer Funktion über dessen Bindung an eine Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne, die einen weiteren Proteinabschnitt des Fusionsproteins darstellt, erfolgt. Neben einer Verringerung von Nebenwirkungen auf Nicht-Zielgewebe kann dieses System vorteilhafterweise auch für Zelloberflächenmoleküle auf den Zielzellen, für die keine Antikörper bzw. Antikörper mit zu geringer Spezifität vorhanden sind, eingesetzt werden.

- 10 Neben den erwähnten Nebenwirkungen ist jedoch ebenfalls die Tatsache äußerst problematisch, daß die aktiven Homotrimere der Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie in Verdünnungen, und das heißt auch bei physiologisch sinnvollen Konzentrationen, dissoziieren. Diese Dissoziation ist zwar grundsätzlich reversibel, jedoch verliert das Protein rasch seine Bioaktivität, da es denaturiert. Es wird angenommen, dass diese Denaturierung über die Stufe der instabilen Monomere erfolgt (Smith, R.A. and Baglioni, C. (1987), J. Biol. Chem. 262, 6951-6954; Narhi, L.O. and Arakawa, T. (1987), Biochem. Biophys. Res. Commun 147, 740-746).

- Aufgrund entsprechender Beobachtungen bei TRAIL, welches eine besondere Labilität aufweist, wurde versucht, eine Stabilität des Proteins durch Anfügen eines Leucin-Zippers als Trimerisierungsmodul zu überkommen (Cha, S.S. et al., (1999), Immunity. 11, 253-261). Im natürlichen Zustand wird TRAIL durch ein Zink-Ion stabilisiert, welches im Zentrum des trimeren Liganden sitzt, und welches durch Cystein-Reste koordiniert wird (Hymowitz, S.G. et al. (2000), Biochemistry 39, 633-640). Nachteilig kann hier jedoch sein, dass durch das Anfügen des Leucin-Zippers nicht nur erhöhte Stabilität erreicht wird, sondern auch andere Eigenschaften, z.B. Struktureigenschaften, wie Strukturveränderungen, Aktivitätsrate oder physiologische Eigenschaften, beeinträchtigt werden könnten.

- Es besteht daher ein Bedarf, die Stabilität aktiver Zytokine, insbesondere Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, zu erhöhen, ohne dass deren natürliche Eigenschaften durch eine Änderung ihrer Struktur nachteilig beeinflusst werden, und ohne daß sie starke zytotoxische oder andere Nebenwirkungen bei therapeutischen Anwendungen zeigen.

Im Stand der Technik sind keine Systeme bekannt, die dies erreichen, d.h., durch welche die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie in einer aktiven und stabilen Form bereitgestellt werden, die ohne die vorgenannten Nachteile selbst oder als biologisch aktive Komponente komplexer Fusionsproteine zur therapeutischen Anwendung geeignet sind.

5

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein System bereitzustellen, durch das die Stabilität der Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie erhöht wird.

10 Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst. Insbesondere wird diese Aufgabe durch den Gegenstand des Anspruchs 1 gelöst, nämlich durch die Bereitstellung eines Polypeptids, das mindestens drei Komponenten A und mindestens zwei Komponenten B umfasst, wobei jede Komponente A ein Monomer eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder ein funktionelles Fragment, und/oder eine funktionelle Variante hiervon ist und jede Komponente B ein Peptid-Linker
15 ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß natürlich vorkommende lösliche Zytokinmitglieder der TNF-Ligandenfamilie ihre volle Bioaktivität lediglich als Homotrimere entfalten, aber auf der anderen Seite dazu neigen, über Dissoziation in ihre Mono-
20 mere zu denaturieren.

Es gilt daher, diese Dissoziation der Homotrimere in Monomere zu unterbinden. Erfindungsgemäß wurde dies erreicht, indem mindestens drei Monomere eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie, insbesondere TNF, über ihre C- und N-Termini mittels kurzer Peptid-
25 Linker kovalent miteinander verbunden wurden zu einem „single chain“-Molekül (nachfolgend „sc“), insbesondere zu einem scTNF. Erfindungsgemäß besteht demnach das gesamte Molekül (mindestens drei Monomere eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie mit den zwei Peptid-Linkern) aus einem einzigen Proteinstrang, so dass eine Dissoziation in die Monomere nicht mehr erfolgen kann. Es wurde erfindungsgemäß festgestellt, dass derartig erfindungs-
30 gemäße Moleküle im Vergleich zu ihren entsprechenden löslichen Wildtyp-Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie einen sehr geringen Verlust in ihrer Bioaktivität aufweisen. Es wurde im Gegenteil erfindungsgemäß nicht nur nachgewiesen, dass die Polypeptide der vorliegenden

Erfindung dieselben (qualitativen) Aktivitäten aufweisen wie ihr entsprechendes lösliches Wildtyp Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, sondern auch, dass sie aufgrund ihrer erheblich höheren Stabilität auch zu einem Zeitpunkt noch Bioaktivitäten aufweisen, zu dem das lösliche Wildtyp Mitglied der TNF-Ligandenfamilie seine Aktivität bereits verloren hat, d.h. dissoziiert bzw. denaturiert ist (hierzu wird auf die nachfolgend beschriebenen verschiedenen Stabilitätstests verwiesen, welche in den Beispielen sowie in den Figuren beschrieben werden).

Unter einem „löslichen Wildtyp-Mitglied der TNF-Ligandenfamilie“ ist ein löslicher extrazellulärer Abschnitt eines membranständigen Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie zu verstehen. Nachfolgend werden synonym zu dem Begriff „löslicher/n/s Wildtyp“ die Ausdrücke „Wildtyp“, „wt“, „löslich“ und „s“ (für „soluble“) verwendet. Insbesondere kann es sich um lösliches Wildtyp TNF (als ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie) handeln, für das entsprechend nachfolgend die synonymen Begriffe „Wildtyp TNF“, „wtTNF“, lösliches TNF und „sTNF“ verwendet werden.

Eine Komponente A im Sinne der Erfindung ist ein Monomer eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder ein funktionelles Fragment oder eine funktionelle Variante hiervon. Unter einem „Monomer“ ist die kleinste Protein- oder Polypeptideinheit zu verstehen, die von einem oligomeren Protein ohne Trennung kovalenter Bindungen separiert werden kann.

Ein Polypeptid oder eine Komponente A oder ein Fragment oder eine Variante hiervon sind im Sinne der Erfindung funktionell, sofern es/sie seine/ihre biologische Aktivität bzw. Funktion aufweist, insbesondere seine/ihre Bindungseigenschaft an einen Interaktionspartner, z.B. einen membranständigen Rezeptor, und auch seine/ihre Trimerisierungseigenschaft. Bei den funktionellen Fragmenten und den funktionellen Varianten der Erfindung können diese biologischen Funktionen zwar verändert sein, z.B. hinsichtlich ihrer Spezifität oder Selektivität, die grundsätzliche biologische Funktion wird jedoch beibehalten.

Im Stand der Technik sind zahlreiche Verfahren zur Messung der biologischen Aktivität eines Proteins, Polypeptids bzw. Moleküls bekannt, bspw. Protein-Assays, die markierte Substrate verwenden, Substratanalysen durch chromatographische Verfahren, wie HPLC oder Dünnschicht-Chromatographie, spektrophotometrische Verfahren etc. (siehe z.B. Maniatis et al.

(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY).

Unter einem Fragment im Sinne der Erfindung ist sowohl ein Fragment eines Monomers
5 eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie als auch ein Fragment eines Polypeptids bzw. Proteins der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Es kann sich hierbei um N-terminal, C-terminal oder intrasequentiell verkürzte Aminosäuresequenzen des Monomers, Polypeptids bzw. Proteins handeln. Insbesondere bei intrasequentiellen Verkürzungen des Polypeptids bzw. Proteins kann es sich um Verkürzungen der Sequenz eines oder mehrerer der drei Mo-
10 nomere handeln, die wiederum N-terminal, C-terminal oder intrasequentiell auftreten können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt das Fragment eines Monomers dessen extrazelluläre Domäne dar, die der gesamten extrazellulären Domäne des löslichen Wildtyp Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder einem Abschnitt hiervon ent-
15 spricht. Insbesondere stellt das Fragment eines Monomers dessen extrazelluläre Domäne dar, die entweder dem löslichen Wildtyp TNF (Aminosäuren 77-233) oder der gesamten extrazellulären Domäne (Aminosäuren 53 – 233) entspricht.

Die Herstellung solcher erfindungsgemäßer Fragmente ist im Stand der Technik gut bekannt
20 und kann von einem Fachmann unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt werden (siehe z.B. Maniatis et al. (2001), Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Im allgemeinen kann die Herstellung von Fragmenten der Monomere, Polypeptide bzw. Proteine durch Modifizieren der DNA-Sequenz, die das native Monomer, Polypeptid bzw. Protein codiert, gefolgt von einer Transformation dieser DNA-
25 Sequenz in einen geeigneten Wirt und Expression dieser modifizierten DNA-Sequenz, unter der Voraussetzung, daß die Modifikation der DNA die funktionellen Aktivitäten des Monomere, Polypeptids bzw. Proteins nicht zerstört, durchgeführt werden.

Die Identifizierung eines erfindungsgemäßen Fragments kann entweder über die Überprü-
30 fung seiner Funktionalität durch Messung seiner biologischen Aktivität erfolgen, wie oben beschrieben, oder auch anhand einer Sequenzierung des Fragments und einem nachfolgenden

Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der nativen Sequenz. Die Sequenzierung kann anhand von Standardverfahren, die im Stand der Technik zahlreich und gut bekannt sind, erfolgen.

Als Varianten von biologisch aktiven Monomeren, Polypeptiden bzw. Proteinen oder Fragmenten hiervon oder einer Komponente A im Sinne der Erfindung werden insbesondere solche Monomere, Polypeptide bzw. Proteine oder Fragmente hiervon bezeichnet, welche Sequenzunterschiede zu den entsprechenden nativen Sequenzen aufweisen. Bei diesen Sequenzabweichungen kann es sich um eine oder mehrere Insertion(en), Deletion(en) und/oder Substitution(en) von Aminosäuren handeln, wobei eine Sequenzhomologie von mindestens 60%, bevorzugt 70%, stärker bevorzugt 80%, ebenfalls stärker bevorzugt 85%, noch stärker bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 97% vorliegt.

Um die prozentuale Identität zweier Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen zu bestimmen, können die Sequenzen abgeglichen werden, um nachfolgend miteinander verglichen zu werden. Hierfür können z.B. Lücken in die Sequenz der ersten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz eingeführt werden und die Aminosäuren bzw. Nukleotide an der entsprechenden Position der zweiten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz verglichen werden. Wenn eine Position in der ersten Aminosäuresequenz mit der gleichen Aminosäure bzw. dem gleichen Nukleotid besetzt ist, wie es an einer Position in der zweiten Sequenz der Fall ist, dann sind beide Sequenzen an dieser Position identisch. Die prozentuale Identität zwischen zwei Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl identischer Positionen geteilt durch die Sequenzen.

Die Bestimmung der prozentualen Identität zweier Sequenzen kann anhand eines mathematischen Algorithmus durchgeführt werden. Ein bevorzugtes, jedoch nicht beschränkendes, Beispiel eines mathematischen Algorithmus, der für den Vergleich zweier Sequenzen herangezogen werden kann, ist der Algorithmus von Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Ein solcher Algorithmus ist in dem NBLAST-Programm integriert, mit dem Sequenzen identifiziert werden können, die eine gewünschte Identität zu den Sequenzen der vorliegenden Erfindung besitzen. Um einen Lücken-Abgleich (auch "gapped alignment"), wie oben beschrieben, zu erhalten, kann das "Gapped BLAST"-Programm verwendet werden, wie in Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 beschrieben.

Biologisch aktive, also funktionelle, Varianten von Monomeren, Polypeptiden bzw. Proteinen oder Fragmenten hiervon im Sinne der Erfindung, können vorzugsweise selektive Rezeptorbindungseigenschaften aufweisen, wobei die Variante z.B. hinsichtlich ihrer spezifischen Bioaktivität oder anderer Eigenschaften, insbesondere ihrer Stabilität, optimiert sein kann.

5

Unter den Begriff Varianten fallen insbesondere solche Aminosäuresequenzen, die gegenüber den physiologischen Sequenzen konservative Substitution aufweisen. Als konservative Substitutionen werden solche Substitutionen bezeichnet, bei denen Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden, die aus der gleichen Klasse stammen. Insbesondere gibt es Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, positiv oder negativ geladenen Seitenketten, aromatischen Gruppen in der Seitenketten oder Aminosäuren, deren Seitenketten Wasserstoffbrücken eingehen können, bspw. Seitenketten, die eine Hydroxyfunktion besitzen. Das bedeutet, daß bspw. eine Aminosäure mit einer polaren Seitenkette durch eine andere Aminosäure mit einer gleichfalls polaren Seitenkette ersetzt wird oder beispielsweise eine durch eine hydrophobe Seitenkette gekennzeichnete Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit gleichfalls hydrophober Seitenkette substituiert wird (z.B. Serin (Threonin) durch Threonin (Serin) bzw. Leucin (Isoleucin) durch Isoleucin (Leucin)). Insertionen und Substitutionen sind insbesondere an solchen Sequenzpositionen möglich, die keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur hervorrufen oder den Bindungsbereich betreffen. Eine Veränderung einer dreidimensionalen Struktur durch Insertion(en) oder Deletion(en) ist bspw. mit Hilfe von CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) leicht überprüfbar (Urry, 1985, Absorption, circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam).

Geeignete Verfahren zur Herstellung von Varianten, z.B. von Monomeren, Polypeptiden bzw. Proteinen oder Fragmenten hiervon mit Aminosäuresequenzen, die gegenüber der (den) nativen Sequenzen Substitutionen aufweisen, werden bspw. in den Druckschriften US 4,737,462, US 4,588,585, US 4,959,314, US 5,116,943, US 4,879,111 und US 5,017,691 offenbart. Die Herstellung von Varianten im allgemeinen wird insbesondere auch von Maniatis et al, (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben. Es können hierbei Codons weggelassen, ergänzt oder ausgetauscht werden. Varianten können insbesondere auch solche Proteine oder Polypeptide sein, die stabilisiert sind,

um der physiologischen Degradation zu entgehen, bspw. durch Stabilisierung des Proteinerückgrats durch Substitution der amidartigen Bindung, bspw. auch durch den Einsatz von β -Aminosäuren.

- 5 Varianten im Sinne der Erfindung können ebenfalls hergestellt werden, indem in die Nukleinsäuren, welche für die Varianten codieren, Veränderungen eingeführt werden, wie bspw. Insertionen, Deletionen und/oder Substitutionen einer oder mehrerer Nukleotide. Im Stand der Technik sind zahlreiche Verfahren für derartige Veränderungen von Nukleinsäuresequenzen bekannt. Eine der meist verwendeten Technik ist die Oligonukleotid-gerichtete Orts-
- 10 spezifische Mutagenese (siehe Comack B., Current Protocols in Molecular Biology, 8.01-8.5.9, Ausubel F. et al., Aufl. 1991). Bei dieser Technik wird ein Oligonukleotid synthetisiert, dessen Sequenz eine bestimmte Mutation aufweist. Dieses Oligonukleotid wird dann mit einem Template hybridisiert, das die Wildtyp-Nukleinsäuresequenz enthält. Bevorzugt wird bei dieser Technik ein einzelsträngiges Template verwendet. Nach dem Annealing von Oligonukleotid und Template, wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, um den zweiten
- 15 Strang des Oligonukleotids, der komplementär zu dem Template-DNA-Strang ist, zu synthetisieren. Als Ergebnis wird ein Heteroduplex-Molekül erhalten, welches eine Fehlpaarung enthält, die durch die oben erwähnte Mutation in dem Oligonukleotid entsteht. Die Oligonukleotidsequenz wird in ein geeignetes Plasmid eingeführt, dieses wird in eine Wirtszelle
- 20 eingeführt und in dieser Wirtszelle wird die Oligonukleotid-DNA repliziert. Mit dieser Technik erhält man Nukleinsäuresequenzen mit gezielten Veränderungen (Mutationen), welche für die Herstellung von Varianten gemäß der Erfindung verwendet werden können.

- Die von dem Polypeptid der Erfindung umfassten Komponenten A können identisch oder
- 25 verschieden sein, d.h. es kann sich bei den Komponenten A um Monomere desselben Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder verschiedener Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie handeln. Es kann sich beispielsweise bei drei verschiedenen Komponenten A um drei Monomere von drei verschiedenen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie handeln oder um zwei Monomere desselben Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie und ein Monomer eines anderen
- 30 Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie. Dies gilt für mehr als drei Komponenten A entsprechend. Beispielsweise kann ein erfindungsgemäßes Polypeptid 4, 5, 6 oder mehr Komponenten A enthalten, die ein Tetramer, Pentamer, Hexamer, etc. bilden. Ebenfalls besonders be-

vorzugt enthält ein erfindungsgemäßes Polypeptid ein ganzzahliges Vielfaches eines wie zuvor beschriebenen Trimers der Komponenten A, z.B. zwei, drei, vier, oder mehr hintereinander angeordnete Trimere. Die in erfindungsgemäßen Polypeptiden enthaltenen Komponenten A können durch Linker voneinander getrennt sein (siehe unten). Sind dabei, wie oben be-

5 beschrieben, zwei, drei, vier, oder mehr Trimere der Komponenten A hintereinander angeordnet, so können die Linker, die die verschiedenen Trimere miteinander verbinden, gegebenenfalls länger sein, als die Linker, die die Komponenten A in einem einzelnen Trimer miteinander verbinden.

- 10 Die Komponenten A der Erfindung können aus dem gleichen oder verschiedenen Organismen stammen. Es kann sich hierbei um Vertebraten, insbesondere um Säugetiere, beispielsweise der Maus, der Ratte, dem Schwein und vor allem dem Menschen, handeln.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den Komponenten

15 A des Polypeptids der Erfindung jeweils um ein Monomer eines der Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie oder ein funktionelles Fragment oder eine funktionelle Variante hiervon, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FasL (GenBank Zugriffsnr. NM_000639), TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand; GenBank Zugriffsnr. NM_003810), auch Apo2L genannt, TNF (Tumor Nekrose Faktor; GenBank Zugriffsnr. NM_000594), LT alpha (Gen-

20 Bank Zugriffsnr. NM_000595), Lymphotoxin beta (GenBank Zugriffsnr. NM_002341), NGF (GenBank Zugriffsnr. NM_002506), CD30L (CD153; GenBank Zugriffsnr. NM_001244), CD40L (CD154; GenBank Zugriffsnr. NM_00074), OX40L (GenBank Zugriffsnr. NM_003326), RANKL (GenBank Zugriffsnr. NM_003701), TWEAKL (GenBank Zugriffsnr. NM_003809), LTalpha, LTbeta, LIGHT (GenBank Zugriffsnr. NM_003807),

25 CD27L (GenBank Zugriffsnr. NM_001252), 4-1BBL (GenBank Zugriffsnr. NM_003811), GITRL (GenBank Zugriffsnr. NM_005092), APRIL (GenBank Zugriffsnr. NM_172089), EDA (GenBank Zugriffsnr. NM_001399), VEGI (GenBank Zugriffsnr. NM_005118) und BAFF (GenBank Zugriffsnr. NM_006573).

- 30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der wie oben definierten Komponente A des Polypeptids der Erfindung um ein Monomer eines der Mitglieder der

TNF- Ligandenfamilie, das resistent gegen das Prozessierungsenzym TACE ist. TACE ist ein Mitglied der ADAM Protease Familie und stellt das physiologische TNF-spezifische Prozessierungsenzym des natürlicherweise in der Zellmembran befindlichen TNF dar. TNF wird üblicherweise von der Zellmembran abgespalten und in die Umgebung freigesetzt. Einer

5 erfindungsgemäßen, gegen TACE resistenten, Komponente A, fehlt bevorzugt die Spaltstelle Ala-Val (z.B. AS 76-77 bei scTNF gemäß SWISSPROT Nomenklatur für humanes TNF, No. PO1375). Die Spaltstelle kann dabei erfindungsgemäß durch Deletion einer oder beider relevanten Aminosäuren Ala oder Val entfernt werden. Alternativ oder zusätzlich kann erfindungsgemäß die Erkennungssequenz für TACE (z.B. AS 77-88 bei scTNF gemäß

10 SWISSPROT Nomenklatur für humanes TNF, No. PO1375) ganz oder teilweise deletiert werden. Dies erfolgt bevorzugt durch Deletion von zwei, drei, vier oder mehr Aminosäuren, bspw. aller Aminosäuren der TACE Erkennungssequenz. Für scTNF liegt beispielsweise die TACE resistente Sequenz im Bereich der Aminosäuren 89-233 (AS 89-233) des scTNF gemäß SWISSPROT Nomenklatur für humanes TNF, No. PO1375. Eine solche Deletion in

15 Komponente A verhindert eine potentielle Spaltung der Komponente A, z.B. scTNF, durch TACE nahe der Verknüpfungsstellen der Komponenten A im Bereich der Linker (Komponente B, siehe unten), und erhöht damit die *in vivo* Stabilität der erfindungsgemäßen Polypeptide. Gegebenenfalls kann die durch die Deletion entstehende Verkürzung der Sequenz durch eine entsprechende Verlängerung der Linker kompensiert werden. Die beispielhaft für

20 scTNF beschriebene Deletion der Sequenz der Komponente A kann auf jede der oben genannten Komponenten A angewendet werden. Sollte die TACE-Sequenz nicht oder nur teilweise entfernt werden, so wird bevorzugt darauf geachtet, daß bei Verwendung zusätzlicher Komponenten B oder C (siehe unten) im erfindungsgemäßen Polypeptid die TACE-Erkennungssequenz und die TACE Spaltstelle nicht wiederhergestellt werden.

25

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform sind die wie oben definierten Komponenten A des Polypeptids der Erfindung so modifiziert, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide kovalent an Oberflächen koppeln können. Diese Kopplung erfolgt bevorzugt an planaren Oberflächen oder an sphärischen Partikeln, wie z.B. an magnetische Partikel

30 (Magnetbeads), oder an Nanopartikel/Mikropartikel, vorzugsweise als Zell-mimetisches, therapeutisches Reagenz mit dem membrangebundenem TNF ähnlichen Eigenschaften. Zur Kopplung wird eine Kopplungsgruppe, bevorzugt die SH-Gruppe eines Cysteinrestes, in den

N-terminalen Bereich mindestens einer Komponente A eines erfindungsgemäßen Polypeptids eingeführt. (Weitere erfindungsgemäß bevorzugte Kopplungsgruppen werden weiter unten beschrieben). Dies kann besonders bevorzugt durch Einführen eines Cysteinrestes in Form einer Addition und/oder Substitution an der gewünschten Position erfolgen. Die Kopplungsgruppe kann sich an jeder Position des N-terminalen Bereichs der Komponente A befinden, bevorzugt nahe am N-Terminus. Besonders bevorzugt befindet sich die Kopplungsgruppe in einem Bereich der ersten 1-15, und noch stärker bevorzugt in einem Bereich der ersten 1-10 N-terminalen Aminosäuren. Beispielsweise kann die Modifikation bei einem prokaryotisch exprimierten scTNF nach einem initialen Methionin (Position 2) der Aminosäuresequenz oder bei einem eukaryotisch exprimierten scTNF direkt nach der abgespaltenen Leader-Sequenz eingeführt werden, die also die N-terminalen Aminosäuren der Komponente A darstellen. Alternativ kann bei einem erfindungsgemäß verwendeten Tag, bspw. einem His-Tag, einem Flag-Tag (siehe z.B. Figur 18) erfindungsgemäß eine Kopplungsgruppe eingeführt werden, z.B. resultierend in einem CysHis-Tag mit einem Cystein an Aminosäureposition 9. Eine weitere Alternative beinhaltet das Einführen einer Kopplungsgruppe in eine bzw. beide Komponenten B (Linker) des erfindungsgemäßen Polypeptids.

Bevorzugt wird in einem erfindungsgemäßen Polypeptid nur die am N-Terminus gelegene Komponente A bzw. der weiter N-terminal gelegene Tag mit einer wie oben beschriebenen Kopplungsgruppe versehen/modifiziert. In einer weiteren Ausführungsform werden im Falle eines erfindungsgemäßen Polypeptids, welches 3 Komponenten A enthält, beispielsweise 2 oder 3 der Komponenten A mit jeweils einer Kopplungsgruppe modifiziert, sodass das Gesamtmolekül (das erfindungsgemäße Polypeptid) über zwei bzw. 3 kovalente Bindungen an eine dafür geeignete Matrix gekoppelt werden kann. Die Kopplung des erfindungsgemäßen Polypeptids über eine oder mehrere Kopplungsgruppen aller Komponenten A eines erfindungsgemäßen Polypeptids beeinträchtigt bevorzugt nicht die Funktion der einzelnen Komponenten A, z.B. von TNF, sondern ermöglicht vielmehr eine Verbesserung der Immobilisation, bspw. von scTNF, an Oberflächen und/oder Partikel. Wie zuvor ausgeführt, z.B. bei scTNF wie auch bei scFasL und scTRAIL oder anderen Mitgliedern der TNF-Familie in der sc-Form, enthält jedes der erfindungsgemäßen Polypeptide bevorzugt die für die biologische Funktion notwendigen Untereinheiten (Komponenten A) in einer funktionell relevanten An-

ordnung. Durch die Kopplung eines erfindungsgemäßen Polypeptids an eine Oberfläche/einen Partikel ist es erfindungsgemäß möglich Oberflächen bzw. Partikel mit z.B. gekoppelten TNF-Homo- oder Heterotrimeren bzw. -multimeren herzustellen. Auf diesen Oberflächen/Partikeln sind die gekoppelten TNF-Homo- oder Heterotrimere bzw. -multimere stabil und bioaktiv immobilisiert sind. Durch das erfindungsgemäße single-chain Prinzip ist der funktionell relevante trimere Zustand der Komponenten A durch die Komponenten B stabilisiert, wodurch sichergestellt ist, dass nach kovalenter Kopplung an eine Oberfläche/den Partikel eine Dissoziation einzelner Komponenten A ausgeschlossen und damit Verlust der biologischen Aktivität verhindert wird.

Eine bevorzugte Eigenschaft solcher erfindungsgemäß an Oberflächen oder Partikel gekoppelten Polypeptide ist ihre biomimetische Aktivität, die der natürlicher, membranständiger Liganden der TNF Familie entspricht. Beispielsweise erlangt ein erfindungsgemäßes, immobilisiertes scTNF eine hohe Affinität für TNFR2 und damit hohe Signalfähigkeit.

Erfindungsgemäße Polypeptide, die wie oben beschriebene, mit einer Kopplungsgruppe modifizierte, Komponenten A enthalten und an eine Oberfläche und/oder Partikel gekoppelt werden/sind, können erfindungsgemäß zur Detektion wie auch zur Manipulation, Depletion und/oder Entfernung von Bindungspartnern von Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie wie auch damit assoziierten Verbindungen eingesetzt werden. Von vorrangigem Interesse sind dabei Verfahren zur extrakorporalen Manipulation, Depletion und/oder Entfernung von in Körperflüssigkeiten enthaltenen Bestandteilen, z.B. mittels Apherese.

Die nachfolgenden Ausführungen zu den Gegenständen der Erfindung beziehen sich insbesondere auf das TNF-Ligandenfamilienmitglied TNF, sie sind jedoch auf alle anderen Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie übertragbar.

Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung umfassen neben den beschriebenen Komponenten A (Monomere mindestens eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie) mindestens zwei Komponenten B, wobei die Komponente B die Eigenschaft eines Peptid-Linkers aufweist.

Als Peptid-Linker im Sinne der Erfindung ist jede in einem biologischen System exprimierbare Peptidsequenz denkbar. Peptidlinker stellen sich bei den erfindungsgemäßen Polypeptidkonstrukten bspw. als eine flexible Verbindung dar, die vorzugsweise jedoch die intrinsischen Trimerisierungseigenschaften des betreffenden Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie nicht negativ beeinflusst. Vorzugsweise werden Linker mit solchen Eigenschaften, insbesondere Flexibilität und Länge, gewählt, welche die spontan gebildeten Homotrimeren des jeweiligen Liganden(derivats) zu stabilisieren vermögen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der Komponente B demnach um Peptidlinker bestehend aus 2 bis 30, bevorzugt zwischen 4 und 16 und besonders bevorzugt zwischen 4 und 12 Aminosäuren, welche bevorzugt repetitive Glycin-Serin-Strukturen, ganz bevorzugt Gly-Gly-Gly-Ser-Module (GGGS-Module) in repetitiver Anordnung enthalten.

Bevorzugt handelt es sich bei den Peptid-Linkern der Erfindung also um Glycin (G) reiche Peptid-Linker, d.h. dass die Aminosäuresequenz eines Peptid-Linkers einen hohen Glycin-Anteil, vorzugsweise von 60 bis 80%, besonders bevorzugt von 75%, aufweist.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst der Peptid-Linker (Komponente B) die Aminosäuresequenz GGGSGGGSGGGS, auch $(GGGS)_3$ oder L_{short} genannt, oder die Aminosäuresequenz GGGSGGGSGGGSGGS, auch $(GGGS)_4$ oder L_{long} genannt. Die Peptid-Linker werden erfindungsgemäß u.a. als L1 und L2 bezeichnet, so dass sich auch Bezeichnungen wie $L1_{short}$, $L2_{short}$, $L1_{long}$ und/oder $L2_{long}$ ergeben. Eine Verwendung zweier unterschiedlicher Linker zur Stabilisierung eines trimeren Moleküls ist möglich.

Bevorzugt verknüpfen die Peptid-Linker gemäß der Erfindung, also die Komponenten B, jeweils zwei der mindestens drei Komponenten A miteinander. Diese Verknüpfung erfolgt kovalent über den C-Terminus einer Komponente A und dem N-Terminus einer weiteren Komponente A. Das Polypeptid gemäß der Erfindung stellt ein Einzelketten-Molekül (auch single chain- oder sc-Molekül genannt) dar. Das bedeutet, daß sämtliche Komponenten A und Komponenten B, die das erfindungsgemäße Polypeptid umfasst, auf einem einzigen Polypeptid- bzw. Proteinstrang liegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bilden die Komponenten A und die Komponenten B eine trimere Proteinstruktur aus. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine homotrimere Proteinstruktur, jedoch sind auch heterotrimere Proteinstrukturen von der Erfindung umfasst.

Die Ausbildung dieser trimeren Proteinstruktur wird bevorzugt durch die Komponente B bewirkt und/oder durch sie verstärkt. Da die zur Trimerisierung führende Komponente B bzw. die eine Trimerisierung verstärkende Komponente B des erfindungsgemäßen Polypeptids im wesentlichen keine höheren Aggregate bilden sollte, sollte die Komponente B typischerweise keinen Cysteinrest aufweisen, der eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann. Vorzugsweise wird die Komponente B in einem erfindungsgemäßen Polypeptid daher keinen Cysteinrest oder nur solche Cysteinreste, die eine intramolekulare Disulfidbrücke, also im erfindungsgemäßen Polypeptid selbst, besitzen, um zu vermeiden, daß unter oxidierenden Bedingungen eine kovalente Verknüpfung mit dem mindestens einen Cysteinrest eines Fusionsproteins eines anderen Trimers auftreten kann.

Die Sequenzen von nativen Polypeptiden oder Fragmenten dieser nativen Polypeptide, die als Peptid-Linker erfindungsgemäß eingesetzt werden, können auch in Form biologisch aktiver funktioneller Varianten derselben im Sinne dieser Erfindung und nach obiger Definition vorliegen.

Bei den erfindungsgemäßen Komponenten B kann es sich um identische oder verschiedene natürlich vorkommende Peptid-Sequenzen handeln. Sie können aus dem gleichen oder verschiedenen Organismen stammen. Bei den Organismen kann es sich um Vertebraten, insbesondere um Säugetiere, beispielsweise um die Maus, die Ratte, das Schwein und vor allem um den Menschen handeln.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann neben den Komponenten A und B zusätzliche Sequenzabschnitte aufweisen. Bevorzugt sind in diesem Zusammenhang sog. Tag-Sequenzen, beispielsweise mindestens ein Flag-Tag, also die Aminosäurenfolge DYKDDDDK, und/oder beispielsweise mindestens ein His-Tag (enthaltend mehrere konsekutive Histidine, bspw.

mindestens 5) und/oder weitere Tag- oder antigenische Sequenzen. Ein besonders bevorzugter zusätzlicher Sequenzabschnitt ist eine Leitpeptidsequenz. Vorzugsweise stellt diese Leitpeptidsequenz ein Signal zur Sekretion des Polypeptids bzw. Proteins in eukaryontischen Zellen dar. Diese Leitpeptidsequenz ist vorzugsweise N-terminal angeordnet.

5

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst ein erfindungsgemäßes Polypeptid eine weitere Komponente C, wobei diese charakterisiert ist durch spezifische Wechselwirkung mit einem komplementären Zelloberflächenmolekül („Antigen“). Das Wirkprinzip erfindungsgemäßer Polypeptidkonstrukte, wie bspw. erfindungsgemäße Konstrukte mit dem Apoptoseinduktor TRAIL oder FasL als Komponente A ist insbesondere für all diejenigen Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie zutreffend, die für bestimmte Rezeptoren ausschließlich oder in besonders gutem Maße als Membranmolekül wirksam sind. Hierzu gehören neben TRAIL (TNFSF10), FasL (TNFSF6) und TNF (TNFSF2) bspw. auch die Immunmodulatoren CD40L (TNFSF5) und CD30L (TNFSF8). Komponente C hat damit „targeting“ Funktion. Dementsprechend ist die Komponente C ein Antikörperfragment, vorzugsweise ein Einzelketten-Antikörperfragment, sog. scFv, oder ein Antikörperderivat das ein spezifisches Zielmolekül auf einer Zelloberfläche erkennt. In einer weiteren Ausführungsform ist die Komponente C ein nicht den Antikörpern zugehöriges Protein bzw. Peptid, welches aber analog zu einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung bzw. einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung ebenfalls ein spezifisches Zielmolekül auf einer Zelloberfläche selektiv erkennt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung ein wie oben beschriebenes erfindungsgemäßes Polypeptid als Komponente A mindestens ein wie oben definiertes Mitglied der scTNF Familie, z.B. scTNF, sowie als Komponente C ein wie oben beschriebenes Antikörperfragment, z.B. scFv. Dadurch entstehen kleinere erfindungsgemäße Polypeptide mit jeweils einer „targeting-Domäne“. Solche kleineren erfindungsgemäßen Polypeptide sind vorteilhafterweise weniger anfällig für z.B. Aggregation.

10
15
20
25

Bevorzugt handelt es sich bei der Komponente C um ein Antigen-bindendes Antikörperfragment oder ein Antigen-bindendes Antikörperderivat eines Säugetiers, insbesondere murinen oder humanen Ursprungs, oder es handelt sich um ein humanisiertes Antikörperfragment oder ein humanisiertes Antikörperderivat, z.B. mit Säugetierursprung. Im Falle der Derivatisierung und/oder Humanisierung besteht die Komponente C typischerweise aus einem nach

30

dem Stand der Technik hergestellten single chain Fv-Derivat murinen, durch CDR grafting humanisierte Komponente C oder es handelt sich um eine Komponente C vollständig humanen Ursprungs die entsprechend zu einem scFv-Derivat umgewandelt wurde.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Komponente C um einen Protein- oder Peptid-Liganden, der als Monomer eine spezifische Bindung an einem Membranrezeptor eingeht.

- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Komponente C um ein Protein oder Peptid mit Spezifität für Zelloberflächenmoleküle, das insbesondere ein Zytokinrezeptor, ein Wachstumsfaktorrezeptor, ein Integrin oder Zelladhäsionsmolekül ist. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Zytokinrezeptor, der aus der Gruppe der TNFR-Genfamilie ausgewählt ist.

- 15 Die Komponente C eines erfindungsgemäßen Polypeptids weist vorzugsweise Spezifität für ein im Tumorgewebe selektiv bzw. dominant exprimiertes Antigen auf. Ein solches Tumorigen kann generell auf den malignen Zellen selbst exprimiert sein oder auch im nicht-malignen Anteil des Tumors, den Stromazellen oder dem Tumorendothel exprimiert sein. Derartige Antigene nicht-maligner Gewebeanteile eines soliden Tumors (Karzinom) sind auf
20 der einen Seite genetisch invariant, auf der anderen Seite bei unterschiedlichsten Tumorentitäten vorkommend und damit universelle Tumormarker. Beispiele für solche Liganden für Tumorassoziierung, gegen die eine Komponente C des Polypeptids der Erfindung gerichtet sein kann, sind der VEGFR bzw. der VEGFR/VEGF Komplex sowie das Integrin $\alpha_v \beta_3$ und die
25 Vitronektinisoform β Fn als weitgehend selektive Zielstrukturen des Tumorendothels und das Fibroblast Activation Protein (als selektiver Marker des Tumorstromas). Alle vorgenannten Beispiele können mit spezifischen scFv wirksam erfasst werden, weswegen sich derartige scFv ("single chain Fv") besonders als Komponente C eines erfindungsgemäßen Polypeptids eignen. Auch Galectin kommt hierbei als Tumormarker, gegen den die Komponente C gerichtet ist, in Betracht.

30

Demnach werden Antikörperfragmente in verschiedenen Antikörperformaten, bspw. scFv, insbesondere scFv40, als Komponente C besonders bevorzugt.

In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erkennt das Polypeptid über seine Komponente C als spezifisches Zielmolekül einen Zellmembran-ständigen Rezeptor eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie, bevorzugt unterschiedlich von dem TNF-Ligandenfamilien-Mitglied der Komponente A. Beispiele, die keine abschließende Aufzählung darstellen, solcher möglicher Liganden sind TNFSF1 (LTalpha), TNFSF2 (TNF), TNFSF3 (LTbeta), TNFSF4 (OX40L), TNFSF5 (CD40L), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27L), TNFSF8 (CD30L), TNFSF9 (4-1BBL), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAKL), TNFSF13 (APRIL), TNFSF143B (BLYS), TNFSF14 (LIGHT), TNFSF15 (VEG), TNFSF16 (CD30L), und TNFSF18 (AITRL), sowie EDA, die oder deren funktionelle Fragmente oder funktionelle Varianten der nativen Sequenz oder der Fragmente gleichfalls als Komponente A in einem erfindungsgemäßen Polypeptidkonstrukt dienen können. Insbesondere werden diesbezüglich alle Membran-ständigen Typ II-Proteine (C-Terminus extrazellulär), deren funktionelle Fragmente oder funktionelle Varianten, die eine trimere Organisation ihrer Untereinheiten als Voraussetzung für die biologische Aktivität bedingen, mit offenbart.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid codiert. Ebenfalls umfasst sind Nukleinsäurekonstrukte, die einen für ein erfindungsgemäßes Polypeptid codierenden Sequenzabschnitt sowie einen oder mehrere weitere Sequenzabschnitt(e) enthalten. Bei solchen weiteren Sequenzabschnitten kann es sich bspw. um Sequenzen handeln, die für ein Leitpeptid codieren, das als Signal für die Sekretion des Polypeptids bzw. Proteins gemäß der Erfindung in eukaryotischen Zellen gibt, oder für ein scFv40 codieren, d.h. die Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragments 40, welches spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP ist, oder für ein "Antibody Mediated Apoptosis Inducing Zytokine" (AMAIze) oder für ein HIS/Flag-Tag, eine Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung der exprimierten Proteine bzw. Polypeptide. Diese Aufzählung ist lediglich beispielhaft und nicht abschließend.

Weitere Sequenzen, die von der Nukleinsäuresequenz umfasst sein können, sind ebenfalls nicht-codierende Sequenzen, wie nicht-codierende 3'- und 5' Sequenzen, einschließlich z.B. regulatorische Sequenzen.

Die Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls mit Nukleinsäuresequenzen fusioniert sein, die bspw. für eine Markersequenz codieren oder für eine Sequenz codieren, die ein Polypeptid codiert, welches bspw. die Isolierung oder Aufreinigung des Polypeptids der Erfindung erleichtert. Repräsentative Sequenzen schließen bspw. solche ein, die ein Glutation-S-Transferase (GST) Fusionsprotein, ein Polyhistidin (z.B. HIS 6) Hämagglutinin oder HSV-Tag codieren. Diese Aufzählung ist jedoch keinesfalls beschränkend.

Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können DNA oder RNA, insbesondere mRNA sein. Die Nukleinsäuremoleküle können doppel- oder einzelsträngig vorliegen. Einzelsträngige RNA oder DNA kann entweder der codierende (sense) oder der nicht-codierende (antisense) Strang sein.

Die Nukleinsäuren gemäß der Erfindung können bevorzugt isoliert vorliegen. Dies bedeutet, daß das Nukleinsäuremolekül oder die Nukleinsäuresequenz nicht von Nukleinsäuresequenzen flankiert wird, die normalerweise das Gen oder die Nukleinsäuresequenz flankieren (wie in genomischen Sequenzen) und/oder die vollständig oder teilweise aufgereinigt worden sind (wie bspw. in einer DNA- oder RNA-Bibliothek). Bspw. kann eine isolierte Nukleinsäure der Erfindung in Bezug auf das zelluläre Milieu, in welchem es natürlicherweise vorkommt, isoliert sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure eine der in den **Figuren 19 bis 26** dargestellten Nukleinsäuresequenzen oder besteht aus einer dieser Nukleinsäuresequenzen.

Erfindungsgemäß sind auch funktionelle Fragmente oder funktionelle Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäurekonstrukte umfasst, auf die die obigen Ausführungen zu den Begriffen funktionell, Fragment und Variante entsprechende Anwendung finden.

Die Herstellung erfindungsgemäßer Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukten oder funktionellen Fragmenten oder funktionellen Varianten hiervon kann mittels Standardverfahren

durchgeführt werden, die dem Fachmann bekannt sind (siehe z.B. Maniatis et al. (2001) *supra*). Insbesondere Anwendung in diesem Zusammenhang findet die PCR-Technik. Eine Überprüfung der Sequenz hergestellter Nukleinsäuren gemäß der Erfindung kann anhand Sequenzierungs- oder Hybridisierungs-Verfahren erfolgen, welche dem Fachmann ebenfalls geläufig sind.

Ebenfalls von der Erfindung umfasst sind Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren. Bevorzugt codiert das Genprodukt ein Polypeptid der in den **Figuren 19 bis 26** dargestellten Aminossequenzen. Ein Genprodukt der vorliegenden Erfindung betrifft nicht lediglich das Transkript (mRNA) sondern auch Polypeptide oder Proteine, bevorzugt in aufgereinigter Form. Ebenfalls umfasst sind Allele, funktionelle Fragmente oder funktionelle Varianten solcher Genprodukte. Für funktionelle Fragmente oder funktionelle Varianten der Genprodukte gelten die obigen Definitionen dieser Begriffe entsprechend.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen Vektor, welcher die Nukleinsäure enthält, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid codiert. Vorzugsweise handelt es sich bei erfindungsgemäßen Vektoren um Expressionsvektoren, d.h. um Vektoren, die die Fähigkeit zur Expression und/oder Amplifikation der Nukleinsäuren in einer prokaryotischen und/oder eukaryotischen Zelle besitzen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Plasmidvektoren, z.B. pBABEpuro, Phagen oder retrovirale Vektoren, insbesondere auch alle Vektorsysteme, die gentherapeutisch zur Anwendung kommen können, z.B. auch adenovirale Vektorsysteme. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden somit auch gentherapeutische Verfahren mit erfindungsgemäßen Vektoren oder Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten als Behandlungsmethode für die erfindungsgemäß offenbarten medizinischen Indikationen offenbart.

Erfindungsgemäße Vektoren weisen bevorzugt Kontrollsequenzen auf, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ermöglichen bzw. verstärken und die Transkription regulieren. Solche Kontrollsequenzen schließen bspw. Polyadenylierungssignale, Promotoren, z.B. natürliche oder synthetische Promotoren, Enhancer zur Bewirkung der Transkription, Operatorsequenzen zur Regulierung der Transkription, Silencer zur gewebspezifischen Transkription, Sequenzen, die geeignete Ribosomen-Bindungsstellen auf der mRNA codie-

ren, Sequenzen, welche die mRNA stabilisieren und Sequenzen, welche die Termination der Transkription und/oder Translation regulieren. Dies stellt lediglich eine beispielhafte Aufzählung von möglichen Kontrollsequenzen dar. Weitere mögliche Kontrollsequenzen sind im Stand der Technik gut bekannt und sind bspw. beschrieben von Goeddel (1990), Gen Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Die 5 Kontrollsequenzen können modifiziert werden, z.B. durch Deletion, Addition oder Substitution einer oder mehrerer Nukleinsäuren, um ihre Kontrollfunktion zu verstärken.

Es sind insbesondere zahlreiche verschiedene Promotoren für verschiedene Organismen bekannt. Zum Beispiel ist ein bevorzugter Promoter für Vektoren, die in *Bacillus subtilis* verwendet werden, der AprE-Promoter, ein bevorzugter Vektor, verwendet in *E. coli*, ist der T7/Lac-Promotor, ein bevorzugter Promoter, verwendet in *saccharomyces cerevisiae* ist PGK1, ein bevorzugter Promotor, verwendet in *Aspergillus niger* ist glaA, ein bevorzugter Promotor, verwendet in *Trichoderma reesei* (*reesei*) ist cbhI. Promotoren, die für die Verwendung in prokaryotischen 15 Wirtszellen geeignet sind, schließen z.B. beta-Lactamase (Vektor pGX2907 [ATCC39344], enthält das Replicon und das beta-Lactamase Gen), Lactose-Promotor-Systeme (Chang et al. (1978), Nature (London, 275: 615); Goeddel et al. (1979), Nature (London), 281: 544), Alkalische Phosphatase, das Tryptophan (*trp*)-Promotorsystem (Vektor pATH1 [ATCC37695]) und Hybridpromotoren, wie den *tac*-Promotor (isolierbar aus dem Plasmid pDR540 20 [ATCC37282]), ein. Jedoch auch andere bakterielle Promotoren, deren Nukleotidsequenzen allgemein bekannt sind, versetzen einen Fachmann in die Lage, diesen mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zu ligieren, wobei auch Linker oder Adapter verwendet werden können, um gewünschte Restriktionsstellen zu erzeugen. Bevorzugt enthalten Promotoren, die in bakteriellen Systemen verwendet werden, ebenfalls eine Shine-Dalgarno-Sequenz, die funktionsfähig mit der Nukleinsäure verbunden ist. 25

Geeignete Expressionsvektoren können bspw. aus Segmenten von chromosomaler, nicht-chromosomaler und synthetischer DNA bestehen. Hierfür sind zahlreiche Derivate von SV40 und Bakterienplasmiden bekannt. Beispiele sind Plasmide aus *E. coli*, wie col E1, pBK, pCR1, 30 pBR322, pMb9, pUC19 sowie deren Derivate, Plasmide, die für einen weiten Wirtsbereich verwendbar sind, wie RP4, und Phagen-DNAs, wie zahlreiche Derivate des Phagen-Lambda, z.B. NM989, sowie andere DNA-Phagen, z.B. M13 sowie filamentöse einzelsträngige DNA-

Phagen, Hefepasmide, Vektoren, die für die Verwendung in eukaryotischen Zellen geeignet sind, sowie Vektoren, die aus einer Kombination von Plasmid und Phagen-DNA bestehen. Im Stand der Technik sind zahlreiche Expressionstechniken zur Verwendung erfindungsgemäßer Expressionsvektoren bekannt. Solche Techniken werden bspw. allgemein geschrieben
5 in Maniatis et al. (2001) *supra*.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält.

10 Wirtszellen im Sinne der Erfindung sind Zellen, die in der Lage sind als Wirt und Expressionsvehikel für eine(n) erfindungsgemäße(n) Nukleinsäure oder Vektor zu fungieren. Es kann sich hierbei um prokaryontische und eukaryontische Wirtszellen handeln. Prokaryontische – bakterielle – Wirtszellen sind beispielsweise *R. marinus*, *E. coli*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*. Eukaryotische Wirtszellen umfassen beispielsweise
15 Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insektenzellen, wie Sf9, oder Säugetierzellen, wie COS, CHO. Diese Aufzählungen sind keinesfalls abschliessend. Die Wahl einer geeigneten Wirtszelle ist von mehreren Faktoren abhängig, z.B. bei der Einführung eines Vektors in eine Wirtszelle insbesondere von dem verwendeten erfindungsgemäßen Vektor.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Herstellung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektors,
- 25 (b) Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt (a) in eine Zelle.

Das Herstellen einer Nukleinsäure bzw. eines Vektors kann erfindungsgemäß nach den bereits oben beschriebenen Standardverfahren und beispielhaften Beschreibungen erfolgen. Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. des erfindungsgemäßen Vektors in die
30 Wirtszelle kann unter Verwendung jeder geeigneter Standardverfahren erfolgen. Hierzu gehören bspw. Transformation, Elektroporation, Transfektion unter Verwendung von z.B. Kalzi-

umchlorid, Lipofektion, Infektion, Transduktion etc. Diverse Standardverfahren sind bspw. in Maniatis et al. (2001) *supra* beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines
5 erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei dieses Verfahren typischerweise die folgenden Schritte umfasst: (a) Kultivieren einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen, (b) Expression der/des erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. Nukleinsäurekonstrukts unter geeigneten Bedingungen, und (c) Isolieren des Polypeptids aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand.

10

Kultivieren einer Wirtszelle bedeutet, der Wirtszelle ein Wachstum in einem geeigneten Kulturmedium, bei einem geeigneten pH und geeigneten Temperaturen zu ermöglichen. Solche Wachstumsbedingungen sind von den jeweils verwendeten Wirtszellen abhängig und dem Fachmann gut bekannt. Hinweise zum Kultivieren von Zellen finden sich auch in Maniatis et
15 al. (2001), *supra*.

Die Expression des Polypeptids kann hierbei typischerweise nach dem Stand der Technik in geeigneten Expressionssystemen erfolgen, vorzugsweise als sezerniertes Produkt stabiler Transfektanten, z.B. CHO-Zellen oder anderer tierischer Zellen, wie Cos7 oder SF9 (Insektenzellen), oder weiterer eukaryontischer Zellsysteme, beispielsweise *Pichia pastoris*. Vorzugsweise weisen die exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptide jeweilige zur Sekretion in dem Zellsystem geeignete Leadersequenzen auf. Daher werden die zur Expression eingesetzten erfindungsgemäßen Vektoren auch codierende Abschnitte enthalten, die für eine funktionelle Leadersequenz codieren, z.B. wie in Brocks et al. (Immunotechnology 3:173-184, 1997) für
20 Säuger und Insektenzellen beschrieben oder unter Verwendung von beispielsweise pPIC-Zalpha-Vektoren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zur Expression und Sekretion in der Hefe *Pichia pastoris*.
25

Das Isolieren des erfindungsgemäßen Polypeptids aus der Wirtszelle kann durch Standardverfahren, wie Chromatographie-Verfahren, Präzipitationsverfahren usw., die zur Aufreinigung von Polypeptiden und Proteinen geeignet sind, erfolgen (s.a. Maniatis et al. (2001), *supra*.
30

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kommen die Polypeptide, ggf. aber auch Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren oder Wirtszellen, (hier unter der Kategorie „erfindungsgemäße Substanzen“ zusammengefaßt) der Erfindung, als Arzneimittel oder zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen in Betracht.

5

Sofern die erfindungsgemäßen Substanzen eine Komponente C gemäß der Erfindung (s.o. ein Antikörperfragment oder ein anderes spezifisch bindendes Protein/Peptid) umfassen, ist ihre Verwendung insbesondere dann gegeben, wenn die Substanzen nach Bindung des Polypeptids bzw. Fusionsproteins an ein spezifisches, Zellmembran-exprimiertes Zielmolekül, die

10 volle biologische Wirkung über den entsprechenden Rezeptor des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie entfalten. Durch geeignete Auswahl der Spezifität der Targeting-Komponente C wird die Aktivität der erfindungsgemäßen Substanz auf das zu behandelnde Gewebe, z.B. Tumorgewebe, gerichtet und es kann ein auf die jeweilige Indikation/Tumorentität spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden.

15 Ein erfindungsgemäßes Polypeptid wird z.B. bei Anwendung als Tumortheraeutikum, insbesondere zur Behandlung solider Tumore, aber auch lymphatischer Tumore (benigne oder maligne), nach in vivo Verabreichung durch die Targeting Komponente C zunächst spezifisch im Tumoreal durch vom Tumor selbst oder das reaktive Tumorstroma/Tumorgefäßsystem gebildete Membranmarker angereichert und dort TNF-Rezeptorfamilien-positiven Tumorzellen oder sensitiven Zellen des reaktiven tumorversorgenden Normalgewebes, die sensitiv für

20 ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie sind, präsentiert.

Die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen ist aber grundsätzlich auch immer dann zur Anwendung im therapeutischen Bereich erwünscht, wenn die Aktivierung einer Signaltransduktionskette, z.B. die durch die TNF-Rezeptorfamilie ausgelösten Signalkaskaden, bspw.

25 eine apoptotische Signalkaskade, ausgelöst werden soll. Somit kommt die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen bei der Behandlung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung aller hyperproliferativer Erkrankungen in Betracht, bspw. auch zur zielgerichteten Ausschaltung von Zellen des Immunsystems bei überschießenden Immunreaktionen,

30 bspw. bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus und TEN, oder bei fehlgeleiteten Immunreaktionen gegen Fremdanigene, wie sie z.B. bei Infektionserkrankungen (bakteriell (bspw. durch Mykobakterien), viral oder proto-

zoologisch) auftreten können. In Betracht kommt ferner die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen oder allgemeinen hyperinflammatorischen Zuständen, insbesondere chronischen Entzündungen, bspw. auch bei Allergien, aber auch die Behandlung von Abstoßungsreaktionen des Immunsystems des Patienten gegen Fremdgewebe. In den vorgenannten Fällen muss
5 das erfindungsgemäße Polypeptid, z.B. über eine Komponente C, charakteristische Marker auf der Oberfläche der Zielzellen, bei denen vorzugsweise eine apoptotische Signalkaskade mit dem Ziel des Zelltods ausgelöst werden soll, erkennen. Im Falle der Behandlung nach einer Transplantation von Fremdgewebe werden also bspw. die körpereigenen für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Zellen des Immunsystems des Transplantationspatienten als
10 Zielzellen dienen.

Im allgemeinen eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen bzw. Arzneimittel zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumatoide/arthritische Erkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, virale Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

Bei der Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen als Arzneimittel zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen wird dem zu behandelnden Patienten vorzugsweise rekombinant hergestelltes Protein verabreicht. Alternativ werden dem Patienten zu transfizierende Zellen entnommen, diese *in vitro* mit erfindungsgemäßen (Expressions-) Vektoren transfiziert, kultiviert und dann als Retransplantat in den Patienten überführt. Die Transfektion wird vorzugsweise durch Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder (Expressions-) Vektoren vorgenommen, die die Expression an einen regulierbaren Promotor koppeln. Das transfizierte Eigentransplantat kann lokal bspw. injiziert werden – abhängig von der spezifischen Erkrankung und den spezifischen Zielzellen. Lokale Verabreichung ist bspw. im Fall einer Tumorthherapie bevorzugt. Hierbei werden Tumorzellen dem Patienten entnommen, *in vitro* transfiziert und dann, sofern möglich, direkt in den Tumor injiziert, bspw. zur Behandlung von Hauttumoren (z.B. Melanomen), Tumoren des Nervensystems (z.B. Glioblastomen).

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen sowohl zur Herstellung einer Vakzine zur aktiven oder passiven Immunisierung gegen Infektionskrankheiten, insbesondere gegen virale Infektionskrankheiten, als
5 auch zur Herstellung einer Vakzine zur Vakzinierung gegen Röteln, Masern, Poliomyelitis, Tollwut, Tetanus, Diphtherie, BCG, Malaria, Gelbfieber, HIV oder Grippe.

Erfindungsgemäße Substanzen können ebenfalls zur *in vitro*-Diagnose verwendet werden.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur extrakorporalen (*ex vivo*) Manipulation, Depletion und/oder Entfernung von in Körperflüssigkeiten enthaltenen Bestandteilen, wie z.B. Bindungspartnern einer wie oben definierten Komponente A oder daran bindende oder damit assoziierte Zellen. Solche extrakorporalen Verfahren umfassen bevorzugt Verfahren wie z.B. Apherese, insbesondere die grundlegenden Formen der Apherese,
15 rese, die Plasmapherese und die Cytapherese.

Die Plasmapherese beinhaltet erfindungsgemäß die extrakorporale Manipulation, Depletion und/oder Entfernung bestimmter löslicher oder suspendierter Bestandteile im Plasmaanteil des Blutes, sowie die Rückführung des so behandelten Blutes in den Patienten. Dazu wird
20 einem Patienten bevorzugt mittels einer Pheresemaschine peripheres Blut entnommen, dem Blut werden optional gerinnungshemmende Mittel zugesetzt und das Blut wird in seine Hauptkomponenten – feste (rote Blutkörperchen, weisse Blutkörperchen und Blutplättchen) und flüssige Anteile (Plasma) - aufgetrennt. Nach Auftrennung in diese Hauptbestandteile können die in der so erhaltenen Plasmafraktion enthaltenen löslichen oder suspendierten Bestandteile des Blutes in einem weiteren Verfahrensschritt manipuliert, depletiert und/oder
25 entfernt werden, beispielsweise unter Verwendung von erfindungsgemäßen Polypeptiden. Anschließend kann das so behandelte Blutplasma zusammen mit den vorher abgetrennten festen Blutbestandteilen zusammengegeben und dem Patienten reinjiziert werden. Der durch die Plasmapherese bedingte Volumensverlust kann im erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin durch isotonische Kochsalzlösung ersetzt werden. Plasmapherese wird erfindungsgemäß
30 bevorzugt unter Verwendung von Verfahren wie therapeutischem Plasmaaustausch (TPE), Immunabsorption (IA), Fällung (HELP), differentieller Membranfiltration und anderen Mit-

teln durchgeführt. Beispielhaft seien hier Plasmafiltrationssäulen genannt (siehe z.B. US 4,619,639, Asahi Medical Company, hier durch Referenz mit einbezogen). Ebenfalls können Membranfiltrationssysteme (MDF) unter Verwendung von verschiedenen Partikeln und Oberflächen, bspw. Filtern wie, PlasmaFlo®OP-05(W)L und RheoFilter®AR2000 Blutfilter, eingesetzt werden (hergestellt durch Asahi Medical Company, Ltd. of Japan). Alternativ können in erfindungsgemäßen Plasmaphereseverfahren alle geeigneten Oberflächen und Partikel verwendet werden.

Bei der Cytapherese werden erfindungsgemäß im Unterschied zur zuvor beschriebenen Plasmapherese extrakorporal im Blut zirkulierende und/oder an Knochenmark gebundenen zelluläre Bestandteile (rote Blutkörperchen, weiße Blutkörperchen, Stammzellen oder Thrombozyten) oder spezifische Subpopulationen dieser Zellen manipuliert, depletiert und/oder entfernt, um einen klinischen Effekt zu erzielen. Auch hier wird bevorzugt einem Patienten mittels einer Pheresemaschine peripheres Blut entnommen. Dem Blut werden danach optional gerinnungshemmende Mittel zugesetzt und das Blut wird in seine Hauptkomponenten aufgetrennt. Anschließend können in der die Zellbestandteile enthaltenden Fraktion des Blutes diese Zellbestandteile in einem weiteren Verfahrensschritt manipuliert, depletiert und/oder entfernt werden, bevorzugt ebenfalls unter Verwendung von erfindungsgemäßen Polypeptiden. Die so behandelte Fraktion kann abschließend dem Patienten wieder reinjiziert werden. Bevorzugt erfolgt bei der erfindungsgemäßen Cytapherese die Auftrennung des Blutes in verschiedene Fraktionen sowie gegebenenfalls die Abtrennung bestimmter Zellbestandteile des Blutes mittels Verfahren wie Zentrifugation, differentieller Membranfiltration, oder anderen Mitteln. Es können weiterhin Membranfiltrationssysteme (MDF) unter Verwendung von verschiedenen Partikeln und Oberflächen, bspw. Filtern wie, PlasmaFlo®OP-05(W)L und RheoFilter®AR2000 Blutfilter, eingesetzt werden (hergestellt durch Asahi Medical Company, Ltd. of Japan).

In einer dritten erfindungsgemäßen Alternative können die oben beschriebenen Verfahren der Plasmapherese und der Cytapherese miteinander kombiniert werden, beispielsweise um sowohl lösliche oder suspendierter Bestandteile im Plasmaanteil des Blutes wie auch im Blut zirkulierende und/oder an Knochenmark gebundenen zelluläre Bestandteile (rote Blutkörperchen, weiße Blutkörperchen, Stammzellen oder Thrombozyten) oder spezifische Subpopula-

tionen dieser Zellen zu manipulieren, depletieren und/oder entfernen, um einen klinischen Effekt zu erzielen. Eine solche Kombination aus Plasmapherese und Cytapherese wird bevorzugt unter Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide hergestellt.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein (Apherese-) Verfahren zur extrakorporalen Manipulation, Depletion und/oder Entfernung löslicher, suspendierter oder zellulärer Bestandteile des Blutes umfassend die folgenden Schritte:

- Gegebenenfalls Auftrennung des Blutes in eine oder mehrere Fraktionen mit festen und/oder flüssigen Bestandteilen;
- 10 • Bindung von löslichen, suspendierten oder zellulären Bestandteile des Blutes an eine mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid gekoppelte Oberfläche oder Partikel; und
- Gegebenenfalls Abtrennung der gebundenen löslichen, suspendierten oder zellulären Bestandteile des Blutes.

15

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Aphereseverfahrens kann vor der gegebenenfalls stattfindenden Auftrennung des Blutes optional eine Blutentnahme an einem Patienten durchgeführt werden. Weiterhin kann optional das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelte Blut oder die so behandelte Blutfraktion dem Patienten wieder
20 reinjiziert werden. Dazu ist es gegebenenfalls erforderlich, die zuvor aufgetrennten und unter Umständen verschieden behandelten Blutfraktionen mit anderen nicht behandelten festen und/oder flüssigen Bestandteilen des Blutes wiederzuvereinigen. Durch das erfindungsgemäße Verfahren entstandene Volumenverluste können durch Zugabe geeigneter Flüssigkeiten, z.B. durch Zugabe einer isotonischen Kochsalzlösung, ausgeglichen werden.

25

Der im erfindungsgemäßen Aphereseverfahren enthaltene Schritt zur Bindung der löslichen, suspendierten oder zellulären Bestandteile des Blutes an eine mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid gekoppelten Oberfläche oder Partikel kann je nach Erfordernis einmalig oder
mehrmalig durchgeführt werden, um eine gewünschte Selektivität zu erzielen.

30

In dem erfindungsgemäßen Aphereseverfahren werden solche Oberflächen und/oder Partikel eingesetzt, die mit einem erfindungsgemäßen, wie oben definierten Polypeptid, kovalent ge-

koppelt wurden. Dazu wird bevorzugt das erfindungsgemäße Polypeptid über die im Polypeptid enthaltene(n) Kopplungsgruppe(n) A auf die Oberfläche und/oder den Partikel kovalent gekoppelt.

- 5 Eine Kopplung der erfindungsgemäß verwendeten Polypeptide über die einzelnen Komponenten A findet bevorzugt wie in DE 101 44 252 A1 beschrieben statt. Die Kopplung der erfindungsgemäß verwendeten Polypeptide erfolgt dabei bevorzugt an Oberflächen oder Partikeln (Träger) über eine Bindung zwischen ersten auf der Trägeroberfläche vorhandenen funktionellen Gruppen und im Polypeptid über die in Komponenten A enthaltenen Kopplungsgruppen. Diese Kopplungsgruppen sind bevorzugt komplementär zu den funktionellen Gruppen des Trägers und können mit diesen eine affine, vorzugsweise kovalente Bindungen eingehen. Vorzugsweise ist die funktionelle Gruppe der Komponente A innerhalb der Komponente A so positioniert, dass sie außerhalb der für die biologische Aktivität verantwortlichen Domänen des erfindungsgemäßen Polypeptids in einem geeigneten Abstand angeordnet ist. Auf diese Weise ist es erfindungsgemäß möglich, TNF gerichtet und unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivitäten auf dem Träger zu immobilisieren. Nach Immobilisierung ist das erfindungsgemäße Polypeptid bevorzugt so auf der Trägeroberfläche fixiert, dass die dreidimensionale Struktur der für die biologische Aktivität erforderlichen Domäne(n) gegenüber nicht-immobilisiertem erfindungsgemäßigem Polypeptid nicht verändert ist, und dass die Domäne(n) bei Kontakt mit zellulären Reaktionspartnern für diese frei zugänglich ist/sind. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist die funktionelle Gruppe der Trägeroberfläche ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminogruppe, Carboxygruppe, Epoxygruppe, Maleinimidogruppe, Alkylketongruppe, Aldehydgruppe, Hydrazingruppe, Hydrazidgruppe, Thiolgruppe und Thioestergruppe.

- 25 Erfindungsgemäss werden die Kopplungsgruppen der zu immobilisierenden Komponenten A des erfindungsgemäßen Polypeptids ausgewählt aus einer Gruppe, die die gleichen Spezies wie für die funktionelle Gruppe der Trägeroberfläche enthält. Eine im erfindungsgemäßen Aphereseverfahren verwendbare Oberfläche/Partikel (=Träger) weist also auf seiner Oberfläche eine funktionelle Gruppe auf, die kovalent mit einer Kopplungsgruppe des zu immobilisierenden erfindungsgemäßen Polypeptids verknüpft ist, wobei die Kopplungsgruppe des Polypeptids eine andere Gruppe als die funktionelle Protein des Trägers ist. Die beiden mit-
- 30

einander in Bindung tretenden Kopplungsgruppen und funktionellen Gruppen müssen dabei komplementär zueinander sein, das heißt in der Lage sein, eine kovalente Bindung miteinander einzugehen. Wird erfindungsgemäß als funktionelle Gruppe des Trägers beispielsweise eine Aminogruppe verwendet, ist die Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Carboxygruppe. Wird erfindungsgemäß umgekehrt eine Carboxygruppe als funktionelle Gruppe des Trägers verwendet, ist erfindungsgemäß die Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Aminogruppe. Wird erfindungsgemäß als funktionelle Gruppe des Trägers eine Thiolgruppe gewählt, ist erfindungsgemäß die komplementäre Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Maleinimidogruppe. Wird umgekehrt eine Maleinimidogruppe als funktionelle Gruppe des Trägers ausgewählt, ist erfindungsgemäß die komplementäre Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Thiolgruppe. Wird erfindungsgemäß als funktionelle Gruppe des Trägers Alkylketongruppe, insbesondere Methylketon- oder Aldehydgruppe verwendet, ist die funktionelle komplementäre Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Hydrazin- oder Hydrazidgruppe. Wird erfindungsgemäß umgekehrt eine Hydrazin- oder Hydrazidgruppe als funktionelle Gruppe des Trägers verwendet, ist erfindungsgemäß die funktionelle komplementäre Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids eine Alkylketon-, insbesondere Methylketon- oder Aldehydgruppe. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt handelt es sich bei der funktionellen Gruppe auf der Trägeroberfläche um eine Maleinimidogruppe und bei der Kopplungsgruppe der Komponente A des erfindungsgemäßen Polypeptids um eine Thiol-Gruppe.

Die Immobilisierung erfolgt dabei bevorzugt gerichtet. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „gerichtet immobilisiert“ oder "gerichtete Immobilisierung", dass ein erfindungsgemäßes Polypeptid, insbesondere ein scTNF-Mitglied, an definierten Positionen innerhalb des scTNF-Mitglieds dergestalt an einem Träger immobilisiert ist, dass die dreidimensionale Struktur der für die biologische Aktivität erforderlichen Domäne(n) gegenüber dem nicht- immobilisierten Zustand nicht verändert ist und dass diese TNF-Domäne (n), beispielsweise Bindungstaschen für zelluläre Reaktionspartner, bei Kontakt mit zellulären Reaktionspartnern für diese frei zugänglich ist/sind. "Gerichtet immobilisiert" bedeutet auch, dass die Kopplung des erfindungsgemäßen Polypeptids auf der Trägeroberfläche

so erfolgt, dass das immobilisierte Protein bei einer späteren Verwendung in einer zellulären beziehungsweise zellähnlichen Umgebung durch Protein-degradierende Enzyme nicht oder nur sehr langsam degradiert werden kann. Das heißt, das immobilisierte erfindungsgemäße TNF-Molekül ist auf der Trägeroberfläche so ausgerichtet, dass es so wenig wie möglich Angriffspunkte für Proteasen bietet. Zusätzlich kann das erfindungsgemäße Polypeptid vor der
5 Kopplung durch molekularbiologische Verfahren gegen Proteasen resistent gemacht werden, wie z.B. oben für TNF-Mitglieder bei der Protease TACE beschrieben.

Das erfindungsgemäße Polypeptid behält via seiner gekoppelten Komponente(n) A seine
10 biologische Funktion und die Fähigkeit, mit anderen Verbindungen/Stoffen eine Wechselwirkung einzugehen. Enthält ein erfindungsgemäßes Polypeptid beispielsweise drei Komponenten A (Trimer), so werden typischerweise jede, zwei oder bevorzugt nur eine der drei Komponenten A auf der Oberfläche/dem Partikel kovalent gebunden.

15 Zur Kopplung geeignete Oberflächen und/oder Partikel können alle geeigneten Oberflächen und/oder Partikel umfassen, an die sich erfindungsgemäße Polypeptide koppeln lassen. Bevorzugt sind insbesondere Kulturplatten oder sogenannte Mikrobeads, z.B. Dynabeads (Dyna-
20 l Biotech GmbH), nano-beads, Nanopartikel, oder Festphasen wie beispielsweise Nylonwolle, Sepharose, Sephadex, etc.. Erfindungsgemäß ist weiterhin vorgesehen, dass es sich bei den erfindungsgemäss verwendeten Trägersystemen um kompakte oder hohle Nanopartikel mit Grössen zwischen 25 und 1000 nm handelt. Diese bestehen entweder aus organischen oder anorganischen Partikelmaterialien. Die Art des Materials kann erfindungsgemäss entsprechend der späteren Anwendung variiert werden, wobei der Träger der Nanopartikel vorzugsweise aus biologisch verträglichen und/oder biologisch abbaubaren Materialien besteht.
25 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Nanopartikeln" weiterhin Bindematrizen verstanden, die einen Träger mit einer Oberfläche umfassen, an dem chemisch reaktive funktionelle Gruppen angeordnet sind, die mit komplementären funktionellen Gruppen von zu bindenden Molekülen, insbesondere erfindungsgemäße Polypeptide, affine Bindungen, also kovalente und/oder nicht-kovalente Bindungen, eingehen und auf diese Weise
30 die erfindungsgemäßen Polypeptide an ihren Oberflächen stabil fixieren können. Die Träger der Nanopartikel bestehen aus chemisch inerten anorganischen oder organischen Materialien und besitzen eine Grösse von weniger als 1µm, vorzugsweise von 25 bis 500 nm.

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Aphereseverfahrens beinhaltet eine biofunktionalisierte Oberfläche (planar oder als Partikel) z.B. mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid scTNF, welches in der zuvor beschriebenen Art und Weise kovalent und gerichtet auf der Oberfläche immobilisiert wurde. Ein derart biofunktionalisierte Oberfläche, enthaltend beispielsweise mehrere immobilisierte scTNF Moleküle oder Varianten davon, ermöglicht eine hohe Affinität für die jeweiligen komplementären Bindungspartner, beispielsweise TNFR1 und TNFR2. Die Rezeptoren TNFR1 und insbesondere TNFR2 werden in stark erhöhten Konzentrationen als prozessierte, lösliche Moleküle im Blut von Tumorpatienten und bei anderen Erkrankungen gefunden. Die Entfernung von TNFR aus dem Blut von Tumorpatienten führt nachweislich zu klinisch dokumentierten Tumorregressionen, was auf eine Rekonstitution der körpereigenen Abwehr zurückgeführt wird (siehe bspw. Lentz M R, (1999) Therapeutics Apheresis, Vol. 3, No. 1). Ein Aphereseverfahren mit erfindungsgemäßen Polypeptiden, beispielsweise scTNF, ermöglicht, dass bevorzugt beide TNF Rezeptoren gleichzeitig und effizient aus Proben entfernt werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die oben beschriebene Tatsache, dass eine Dissoziation einzelner Komponenten A des erfindungsgemäßen Polypeptids nicht möglich ist, d.h. weder ein Aktivitätsverlust der funktionalisierten Oberfläche noch eine Kontamination des behandelten Blutes mit abdissoziierten Stoffen zu erwarten ist.

Das erfindungsgemäße Aphereseverfahren kann als kontinuierliches Verfahren oder als diskontinuierliches Verfahren durchgeführt werden. Als kontinuierliches Verfahren wird das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt direkt anschließend an die Blutentnahme bzw. die Fraktionierung des entnommenen Blutes und vor der Rückführung des Blutes in den Patienten ohne zwischenzeitliche Lagerung des Blutes oder der erhaltenen Blutfraktionen durchgeführt. In einem diskontinuierlichen Verfahren kann dagegen das entnommene Blut bzw. die Fraktionen des entnommenen Blutes nach jedem Schritt für einen bestimmten Zeitraum gelagert werden.

Die Temperatur in erfindungsgemäßen Aphereseverfahren liegt bevorzugt bei 0-40°C. Bei einem kontinuierlichen Verfahren liegt die Temperatur bevorzugt bei 25 bis 40°C, beson-

ders bevorzugt in einem Bereich zwischen 36 und 38°C. Bei einem diskontinuierlichen Verfahren kann die Temperatur zwischen 0-40°C liegen.

Das wie oben beschriebene erfindungsgemäße Aphereseverfahren wird bevorzugt zur Diagnose, Therapie und/oder Prophylaxe bei mit den mit Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie assoziierten Erkrankungen eingesetzt, insbesondere bei Tumorerkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, insbesondere soliden und lymphatischen Tumoren. Die Wiederherstellung der Homöostase des Immunsystems mit seinen humoralen und zellulären Komponenten wird als Schlüssel der Wirksamkeit von Aphereseverfahren angesehen. In einer weiteren Anwendung kann das erfindungsgemäße Aphereseverfahren deshalb auch zur Wiederherstellung der Immunhomöostase bei nicht malignen Erkrankungen eingesetzt werden. Dazu gehören inflammatorische Erkrankungen, arthritische und rheumatische Erkrankungen, oder Erkrankungen des Immunsystems, sowie zur Behandlung Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumatoider/arthritischer Erkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, virale Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

Bei Tumorerkrankungen sind insbesondere mit umfasst Kolonkarzinome, Melanome, Nierenkarzinome, Lymphome Akute myeloide Leukämie (AML), Akute Lymphoide Leukämie (ALL), chronische myeloide Leukämie (CML), chronische lymphozytische Leukämie (CLL), Gastrointestinale Tumore, Lungenkarzinome, Gliome, Schilddrüsentumore, Mammakarzinome, Prostatakarzinome, Hepatome, diverse virus-induzierte Tumoren wie z.B. Papillomvirus-induzierte Karzinome (z.B. Cervixkarzinom), Adenokarzinome, Herpesviren-induzierte Tumore (z.B. Burkitt's Lymphom, EBV-induziertes B Zelllymphom), Hepatitis B-induzierte Tumore (Hepatozellkarzinome), HTLV-1 und HTLV-2 induzierte Lymphome, Akustikusneurinom, Gebärmutterhalskrebs, Lungenkrebs, Rachenkrebs, Analkarzinom, Glioblastom, Lymphome, Rektumkarzinom, Astrozytom, Hirntumore, Magenkrebs, Retinoblastom, Basaliom, Hirnmetastasen, Medulloblastome, Scheidenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Hodenkrebs, Melanom, Schilddrüsenkarzinom, Blasenkrebs, Hodgkin-Syndrom, Meningeome,

Schneeberger Krankheit, Bronchialkarzinom, Hypophysentumor, Mycosis fungoides, Speiseröhrenkrebs, Brustkrebs, Karzinoide, Neurinom, Spinaliom, Burkitt-Lymphom, Kehlkopfkrebs, Nierenkrebs, Thymom, Corpuskarzinom, Knochenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphome, Urethrakrebs, CUP-Syndrom, Kopf-Hals-Tumore, Oligodendrogliom, Vulvakrebs, Darmkrebs, Kolonkarzinom, Ösophaguskarzinom, Warzenbeteiligung, Dünndarmtumore, Kraniopharyngeome, Ovarial-Karzinom, Weichteiltumore, Eierstockkrebs, Leberkrebs, Pankreaskarzinom, Zervixkarzinom, Endometriumkarzinom, Lebermetastasen, Peniskrebs, Zungenkrebs, Gallenblasenkrebs, Leukämie, Plasmozytom, Gebärmutterkrebs, Lidtumor, Prostatakrebs, etc..

Arthritische Erkrankungen umfassen insbesondere Monarthritis, Oligoarthritis, Polyarthritis, akute Arthritis (v.a. septische, kristallinduzierte, reaktive Arthritis und akute Arkoidose), subakute Arthritis, chronische Arthritis, (v.a. rheumatoide Arthritis, Arthritis bei seronegativer Spondylarthritis), infektiöse Arthritis, para- oder postinfektiöse Arthritis, rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Arthritis bei entzündlichen Bindegewebeerkrankungen und Vaskulitiden, allergische Arthritis, Arthritis in Verbindung mit Stoffwechselerkrankungen und ernährungsbedingten Störungen, Arthritis bei endokrinen Störungen, Arthritis bei granulomatösen Erkrankungen, Arthritis bei Erkrankungen des hämatopoietischen Systems, Arthritis bei Gelenkblutungen infolge von Störungen der Blutgerinnung, neoplastische Arthritis, paraneoplastische Arthritis, (post-)traumatische Arthritis, Arthritis bei Erkrankungen des Gelenkknorpels, Arthritis bei Neuropathien, Arthritis bei pustulösen abszedierenden, nekrotisierenden oder mit Gewebeneutrophilie einhergehenden Dermatosen, Arthritis bei sonstigen extraartikulären Grunderkrankungen, sowie Arthritis allergica, Chlamydien-induzierte Arthritis, Arthritis dysenterica, Arthritis gonorrhoea, Arthritis mutilans, Arthritis psoriatica, Arthritis sicca, Arthritis syphilitica, Arthritis tuberculosa, Arthritis urica, etc..

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung oder ein Vakzin, enthaltend erfindungsgemäße Polypeptide, erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte, erfindungsgemäße Vektoren und/oder erfindungsgemäße Wirtszellen sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder Trägersubstanzen (z.B. auch Lösungsvermittler). Die pharmazeutischen Zusammensetzungen oder Vakzine gemäß der

Erfindung werden bevorzugt zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, eingesetzt sowie zur Behandlung von Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumatoider/arthritischer Erkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multipler Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, viraler Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

- 10 Damit wird erfindungsgemäß auch eine Kombination erfindungsgemäßer Substanzen mit pharmazeutisch akzeptablen Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen offenbart. Entsprechende Herstellungswege sind bei „Remington's Pharmaceutical Sciences“ (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) offenbart, das Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung ist. Für die parenterale Verabreichung kommen als Trägerstoffe bspw. steriles Wasser, sterile
- 15 Kochsalzlösungen, Polyalkylenglykole, hydrogenierte Naphthalen und insbesondere biokompatible Lactidpolymere, Lactid/Glycolidcopolymer oder Polyoxyethylen-/Polyoxypropylencopolymere in Betracht. Derartige erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen kommen für alle oben offenbarten medizinischen Indikationen in Betracht. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Zusammensetzungen Füllsubstanzen oder
- 20 Substanzen, wie Lactose, Mannitol, Substanzen zur kovalenten Anknüpfung von Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol an erfindungsgemäße Inhibitoren, Komplexierung mit Metallionen oder Einschluß von Materialien in oder auf besondere Präparationen von Polymerverbindungen, wie z.B. Polylaktat, Polyglykolsäure, Hydrogel oder auf Liposomen, Mikroemulsion, Micellen, unilamelare oder multilamelare Vesikel, Erythrozyten-Fragmente oder Sphäroplasten, enthalten. Die jeweiligen Ausführungsformen der Zusammensetzungen werden abhängig vom physikalischen Verhalten, beispielsweise in Hinblick auf die Löslichkeit, die Stabilität, Bioverfügbarkeit oder Abbaubarkeit gewählt. Kontrollierte oder konstante Freisetzung der erfindungsgemäßen Wirkstoffkomponente in der Zusammensetzung schließt Formulierungen auf der Basis lipophiler Depots ein (z.B. Fettsäuren, Wachse oder Öle). Im
- 25 30 Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Beschichtungen erfindungsgemäßer Substanzen oder Zusammensetzungen, enthaltend solche Substanzen, nämlich Beschichtungen mit Polymeren offenbart (z.B. Poloxamere oder Poloxamine). Weiterhin können die erfin-

dungsgemäßen Substanzen bzw. Zusammensetzungen protektive Beschichtungen, z.B. Proteaseinhibitoren oder Permeabilitätsverstärker, aufweisen.

Grundsätzlich werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung für erfindungsgemäße Substanzen oder erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen oder Vakzine alle im Stand der Technik bekannten Verabreichungswege offenbart, bevorzugt erfolgt die Herstellung eines Arzneimittels bzw. einer Vakzine zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen oder Störungen auf dem parenteralen, d.h. beispielsweise subkutanen, intramuskulären oder intravenösen, oralen, intranasalen, intraoticalen, transdermalen, topicalen (z.B. via Gele, Salben, Lotionen, Cremes, etc.), intraperitonealen, intrapulmonalen (z.B. AERx® Inhalationstechnologie, kommerziell erhältlich von Aradigm oder Inhance™ Pulmonales Übertragungssystem, kommerziell erhältlich von Inhale Therapeutics), vaginalem, rectalem, oder intraokularem Verabreichungsweg. Typischerweise werden erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen fest, flüssig oder aerosolartig (z. B. Spray) sein – je nach Art der Konfektionierung oder Verabreichung.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird bei Bedarf einem Patienten eine therapeutisch effektive Menge eines erfindungsgemäßen Polypeptids verabreicht. Die genaue Dosis hängt üblicherweise von dem Zweck der zugrundeliegenden Behandlung ab und kann durch einen Fachmann unter Heranziehung bekannter Verfahren aus dem Stand der Technik bestimmt werden. Wie im Stand der Technik bekannt können beispielsweise Anpassungen in Bezug auf den metabolischen Abbau der erfindungsgemäßen Polypeptide, in Bezug auf systemische versus lokale Verabreichung, wie auch an das Alter, Körpergewicht, an den allgemeinen Gesundheitszustand, das Geschlecht, die Ernährung, Zeit der Verabreichung, Wechselwirkung der Wirkstoffe miteinander, oder an die Schwere der Erkrankung notwendig sein. Solche Anpassungen können durch einen Fachmann mittels im Stand der Technik bekannten Verfahren durchgeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Kombination erfindungsgemäßer Polypeptide zur Verwendung als Adjuvanz offenbart. Ein Adjuvanz im Sinne dieser Erfindung ist insbesondere eine Zusammensetzung, die als solche keine spezifische Immunantwort gegen ein Immunogen hervorruft, jedoch in der Lage ist, die Immunantwort gegen dieses Immuno-

gen zu steigern. Anders formuliert ruft eine Verabreichung des Adjuvanz alleine keine Immunantwort gegen dieses Immunogen hervor, während eine Verabreichung zusammen mit diesem Immunogen eine Immunantwort erzeugt wird, die stärker ist Immunantwort nach Verabreichung des Immunogens alleine. Ein Adjuvanz kann zusätzlich pharmazeutisch akzeptable Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthalten oder verabreicht werden, wie hier für Vakzine und pharmazeutische Zusammensetzungen offenbart. Weiterhin kann ein Adjuvanz zusammen mit oben offenbarten Vakzinen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Erfindung ein Polypeptid bereitstellt, das erhöhte Stabilität aufweist, dadurch dass das gesamte Molekül eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie aus einem Protein- bzw. Polypeptidstrang besteht (z.B. scTNF), so daß die Monomere (Komponenten A) der Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie nicht mehr dissoziieren können. scTNF, wie auch erfindungsgemäße Polypeptide, die andere Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie betreffen, zeigt in der Art seiner Bioaktivität keine qualitativen Unterschiede zu dem normalen löslichen sTNF (auch Wildtyp TNF oder wtTNF), ist jedoch weitaus stabiler und zeigt daher höhere Bioaktivität, ist also bei niedrigeren Konzentrationen wirksam. Wie normal lösliches TNF (wtTNF), vermag scTNF in sensitiven Zellen Apoptose auszulösen, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren, den Rezeptor TNFR1, nicht aber TNFR2, zu aktivieren sowie in Gegenwart bestimmter Antikörper (z.B. 80M2) auch den Rezeptor TNFR2 zu aktivieren. Dies gilt für erfindungsgemäße Polypeptide, die andere Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie betreffen. Im Falle einer Verwendung erfindungsgemäßer Polypeptide mit einer Kopplungsgruppe zur Herstellung biofunktionalisierter Oberflächen und Verwendung derselben bspw. zur Apherese ist kein Ausbluten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder eine Rückführung von schädlichen Liganden in das System zu beobachten.

Weiterhin stellt das erfindungsgemäße Polypeptid, beispielsweise scTNF, ein ideales Ausgangsmaterial zur Herstellung neuer, bi-funktioneller Moleküle dar. Zum einen kann das erfindungsgemäße Polypeptid, beispielsweise scTNF, bzw. funktionelle Fragmente hiervon kovalent an Zelloberflächen binden. Das hat erfindungsgemäß den Vorteil, dass hier zur stabilen Bindung des Moleküls nur eine einzige kovalente Bindung hergestellt werden muss. Bei einem normalen löslichen Wildtyp Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, beispielsweise löslichem sTNF, müssen alle drei Monomere des einzelnen Homotrimers kovalent an die Ober-

fläche geknüpft werden, um eine stabile Kontruktion zu erhalten, da sonst die nicht-kovalent gebundenen Monomere abdissoziieren. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polypeptids ist eine Anwendung in der Apherese, z.B. mit scTNF als biofunktionalem Wirkstoff zur Entfernung von TNF Rezeptoren aus Körperflüssigkeiten, besonders vorteilhaft.

5

Entsprechendes gilt bei der Herstellung von Fusionsproteinen. Diese sind insbesondere interessant, um ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, beispielsweise TNF, mit Hilfe eines an das TNF fusionierten Antikörperfragmentes, bspw. scFv, an einen entsprechenden gewünschten Ort im Körper zu konzentrieren (sog. „targeting“ Strategien). Bei normalem löslichen TNF (wtTNF) muss ein solches Fusionsprotein aus homotrimerem TNF bestehen, bei dem jedes der mindestens drei Monomere den Antikörperteil trägt, wodurch große und instabile Moleküle entstehen, die wiederum in ihre Monomere dissoziieren und/oder zur Aggregation neigen und damit inaktiviert werden können. Ein vom scTNF abgeleitetes Fusionsprotein ist mit nur einem Molekül Antikörper verknüpft, so dass das gesamte Fusionsprotein wiederum aus einem einzigen, stabilen Protein- bzw. Polypeptidstrang besteht. Das vorstehend für TNF Beschriebene ist auf alle Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie übertragbar.

10

15

20

25

Ebenfalls ist es durch die vorliegende Erfindung möglich, aufgrund der kovalenten Verknüpfung der Monomere (Komponenten A) des erfindungsgemäßen Polypeptids gezielt Mutationen in nur eines oder auch zwei oder mehrere der mindestens drei Monomere (Komponenten A) stabil einzufügen. So sind z.B. Punktmutationen bekannt, welche eine Rezeptorselektivität erzwingen, d.h. zum Beispiel im Fall von TNF erfolgt eine Bindung nur noch an einen der beiden TNF-Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2). Erfindungsgemäß ist es möglich, erstmals eine z.B. TNF-Mutante herstellen, die beispielsweise gezielt ein Molekül TNFR1 und zwei Moleküle TNFR2 gleichzeitig zu binden vermag, d.h. es entstünden heteromere Rezeptorkomplexe. Auf diese Weise ist es erstmals möglich, heteromere, stabile, single chain Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie herzustellen, die gezielt nur einen von mehreren möglichen Rezeptor binden und aktivieren.

30

Selbstverständlich sind die vorstehenden beispielhaft zu TNF erläuterten Ausführungen auf die anderen Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie übertragbar.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Figuren näher erläutert:

Figuren 1 – 3 zeigen Ergebnisse verschiedener biologischer Zytotoxizitätstests, in denen die Eigenschaften, insbesondere die Spezifität, unterschiedlicher scTNF Varianten mit denen von klassischem löslichem Wildtyp-TNF, d.h. der löslichen extrazellulären Domäne des humanen TNF (NCBI gi:25952111, 17,09 kDa als Monomer der löslichen Form, abgekürzt mit TNFhum oder sTNF, AA 79-181) untersucht verglichen werden.

Für diese Versuche wurden sowohl transfigurierte Mausfibroblasten als auch humane Kym1-Zellen verwendet. Dargestellt werden beispielhafte Ergebnisse der Analysen, wobei scTNF Varianten getestet wurden, die unterschiedlich lange Peptid-Linker zwischen den einzelnen TNF Modulen (d.h. TNF Monomeren) aufweisen. Die Peptid-Linker bestehen jeweils aus der dreifachen bzw. der vierfachen Aminosäuresequenzwiederholung GGS (oder auch GlyGlyGly-Ser) (bezeichnet als „singlechainTNF3x“ bzw. „singlechainTNF4x“ oder als "scTNF3x" bzw. "scTNF4x").

Figur 1 zeigt das Ergebnis eines typischen Zytotoxizitätstests von TNF. Als Zielzellen wurden Mausfibroblasten (MF) aus TNFR1/TNFR2 doppel-knockout-Mäusen verwendet, die stabil TNFR1-Rezeptorchimären (TNFR1-Fas) exprimieren (MF TNFR1-Fas-Zellen). Solche Zellen exprimierten ein Hybridmolekül, das extrazellulär aus dem entsprechenden Teil des TNFR1 besteht, und somit TNF bindet, und intrazellulär die stark apoptotisch wirkende intrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors aufweist. Diese MF TNFR1-Fas Zellen können durch TNFR1-spezifische Stimuli aktiviert werden, vermittelten jedoch ein Fas-spezifisches Todes-signal. Die überlebende Zellzahl wurde nach 24 Stunden durch Anfärben mit einem Farbstoff durch ihre Absorption quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde ein Kontroll-Bakterienlysate eingesetzt, wobei es sich um ein nicht-scTNF exprimierendes Bakterienlysate handelte, das identisch zu den rekombinanten scTNF-Proteinen prozessiert wurde. Im Ergebnis ist festzustellen, dass sowohl das herkömmliche humane lösliche TNF (TNFhum) als auch die rekombinanten scTNF-Varianten zum Zelltod führten. Es ist ein vergleichbarer dosisabhängiger zytotoxischer Effekt von TNFhum bzw. scTNF zu erkennen (siehe die unteren drei Kurven der Grafik.), wobei die spezifische Aktivität des scTNF mindestens äquivalent, wenn nicht

sogar höher, als die des Wildtyp-TNF ist. Wie erwartet, zeigt die Negativkontrolle keinen toxischen Effekt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Wirkung neutralisierender TNF-spezifischer Antikörper auf die Zytotoxizität von Wildtyp TNF (TNF_{hum}) bzw. scTNF getestet. Es wurden frisch angesetzte Verdünnungen von löslichem humanen TNF (TNF_{hum}) bzw. den oben beschriebenen scTNF Varianten mit 3fach (3x) bzw. 4fach (3x) Glycin-Serin Peptid-Linker (scTNF3x: GGGS-GGGS-GGGS / scTNF4x: GGGS-GGGS-GGGS-GGGS) eingesetzt. Es wurden Konzentrationsreihen mit 1:3 Verdünnungen in An- und Abwesenheit neutralisierender TNF-spezifischer Antikörper (α TNF-AK) [1 μ g/mL] eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das oben beschriebenen Kontroll-Bakterienlysate eingesetzt. Als Ergebnis ist zu erkennen, dass der zytotoxische Effekt von löslichem humanem Wildtyp-TNF bzw. scTNF durch neutralisierende TNF-spezifische Antikörper aufgehoben werden kann (siehe die oberen drei Kurven der Grafik.) und zwar in einem weiten Konzentrationsbereich (0,03 - 10 ng/mL). Unterschiede zwischen der Reaktion von scTNF mit 3-fach und scTNF mit 4-fach Peptid-Linker wurden nicht festgestellt werden.

Figur 2 zeigt das Ergebnis eines Zytotoxizitäts-Test, in dem die Wirkung von sTNF und scTNF-Varianten auf TNFR2-Rezeptorchimären (TNFR2-Fas) exprimierende Zellen untersucht wurde. In diesem Versuchsansatz wurden Mausfibroblasten eingesetzt, die stabil Rezeptorchimären, bestehend aus TNFR2 und Fas (TNFR2-Fas, wobei der extrazelluläre Teil von TNFR2, der intrazelluläre Teil vom Fas-Rezeptor stammt), exprimieren (MF TNFR2-Fas Zellen). MF TNFR2-Fas Zellen (wie auch der Wildtyp-TNFR2) können lediglich durch einen adäquaten TNFR2-Stimulus aktiviert werden, beispielsweise durch membranständiges TNF, nicht jedoch durch lösliches TNF. Ergebnis: Wie erwarten, zeigten sowohl das lösliche humane TNF (TNF_{human}) als auch die scTNF Varianten mit 3fach und 4fach Peptid-Linker (scTNF3x, scTNF4x) keinen toxischen Effekt auf die MF TNFR2-Fas Zellen. Mit anderen Worten, sTNF und die scTNF-Varianten vermögen gleichermaßen TNFR2-Chimären (TNFR2-Fas) exprimierende Zellen nicht zu aktivieren, d.h. sie rufen in diesen Zellen keinen Zelltod hervor. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate (wie oben beschrieben) zeigte erwartungsgemäß ebenfalls keinen toxischen Effekt.

Figur 3 zeigt das Ergebnis eines Zytotoxizitäts-Test, in dem die Wirkung von löslichem humanem Wildtyp-TNF und einer scTNF-Variante in Kombination mit einem speziellen TNFR2-spezifischem Antikörper, 80M2, auf TNFR2-Chimären (TNFR2-Fas) exprimierende Zellen untersucht wurde. Der Versuchsansatz entspricht dem aus Figur 2 mit dem Unterschied, dass das lösliche Wildtyp-TNF bzw. das scTNF mit 3fach Peptid-Linker (scTNF3x) zusammen mit dem Antikörper 80M2 zugegeben wurden. Der Antikörper 80M2 ist dafür bekannt, dass er normalem löslichem TNF die besondere Signalkapazität von membrangebundenem TNF verleiht. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl lösliches Wildtyp-TNF als auch scTNF in Kombination mit dem Antikörper 80M2 über die TNFR2-Fas Rezeptorchimäre einen starken zytotoxischen Effekt erzielen. Grund hierfür ist, dass lösliches TNF in Kombination mit bestimmten TNFR2-spezifischen Antikörpern, wie z.B. 80M2, die Aktivität von membrangebundenem TNF entfalten kann. MF TNFR2-Fas Zellen sterben nach Inkubation mit löslichem TNF bzw. dem scTNF in Anwesenheit eines solchen Ligand-Rezeptor Komplex-stabilisierenden Antikörpers (80M2-AK). D.h., in Gegenwart dieses Antikörpers rufen lösliches TNF sowie scTNF gleichermassen einen toxischen Effekt in den MF TNFR2/FAS-Zellen hervor, wie dies sonst nur durch membranständiges TNF erfolgen kann. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysat (wie oben in Fig. 1 beschrieben) zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figuren 4 – 10 zeigen Ergebnisse verschiedener Stabilitätstests, die nachweisen, dass die erfindungsgemäßen scTNF Varianten aufgrund ihrer Struktur über eine erheblich bessere Stabilität verfügen als lösliches Wildtyp-TNF.

Es wurde sTNF bzw. die scTNF Varianten in serumhaltigem Kulturmedium bei Konzentrationen von 3,0 bis 0,01 ng/mL bei 37°C und 5% CO₂ für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurde die Funktionalität der sTNF bzw. scTNF Varianten (scTNF3x, scTNF4x) in Zytotoxizitäts-Tests, basierend auf MF TNFR1-Fas Zellen und Kym1 Zellen, überprüft. Für diesen Zytotoxizitätstest wurden 1:3 Verdünnungen verwendet, ausgehend von einer 3,0 ng/ml TNF-Probe. Als Negativkontrolle wurde das in den oben beschriebenen Zytotoxizitätstests verwendete Kontroll-Bakterienlysat eingesetzt (nicht-scTNF exprimierendes Bakterienlysat, das identisch zu den rekombinanten scTNF-Proteinen prozessiert wurde).

Figur 4 zeigt die Bioaktivität der eingesetzten Moleküle VOR den Stabilitätstests auf Mausfibroblasten MF TNFR1-Fas Zellen. Es wurden lösliches humanes Wildtyp-TNF (TNFhuman) und scTNF Verdünnungen frisch angesetzt und auf den Zellen ausverdünnt. Sowohl das lösliche Kontroll-TNF als auch die scTNF Varianten führten nach Inkubation mit den MF zu deren Zelltod. Das Kontroll-Bakterienlysate zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt. Die ED₅₀-Werte (halbmaximale Wirkkonzentration) lagen bei ca. 0,2 ng/ml für das lösliche humane Wildtyp-TNF und bei 0,1 ng/ml für die zwei eingesetzten unterschiedlichen scTNF Varianten. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 5 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstests mit Mausfibroblasten MF TNFR1-Fas Zellen. Die in Figur 5 gezeigten Wildtyp-TNF und scTNF Verdünnungen waren hierbei für 8 Tage im Zellinkubator vor Durchführung des Tests inkubiert worden, um die Stabilität der Proben beurteilen zu können. Es konnte eine deutliche Abnahme der Bioaktivität des löslichen Wildtyp-TNF (TNFhuman) nach 8 Tagen bei 37°C gemessen werden, während die Aktivität beider scTNF Varianten (scTNF3x, scTNF4x; Erklärung siehe oben) unverändert blieb. Für das Wildtyp-TNF ergab sich ein ED₅₀-Wert von etwa 2 ng/ml (frisch verwendet: 0,2 ng/ml, vgl. Figur 4). Die scTNF Varianten blieben mit ED₅₀-Werten von ca. 0,1 ng/ml genauso aktiv wie die frisch eingesetzten Proben (vgl. Figur 4). Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 6 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstests mit Mausfibroblasten MF TNFR1-Fas Zellen. Die Wildtyp-TNF und scTNF Lösungen waren wie in Figur 5 erklärt jetzt für 14 Tage im Zellinkubator inkubiert worden. Es konnte eine deutliche weitere Abnahme der Bioaktivität des Wildtyp-TNF nach 14 Tagen bei 37°C gemessen werden, während die Aktivität der scTNF Varianten annähernd gleich blieb. Für sTNF ergab sich ein ED₅₀-Wert von etwa 2,8 ng/ml (frisch verwendet 0,2 ng/mL, vgl. Figur 4), die scTNF Varianten blieben mit 0,13 ng/ml fast genauso aktiv wie die frisch angesetzten Proben (0,1 ng/ml, vgl. Figur 4). Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 7 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstest mit der humanen Zelllinie Kym1. Kym1 Zellen exprimieren normale humane Wildtyp TNF Rezeptoren und reagieren ebenfalls zytotoxisch auf TNF. Der Versuch wurde analog zu den Stabilitätstests mit Mausfibroblasten gemäß Figuren 4 – 6 durchgeführt: Es wurden lösliches Wildtyp-TNF bzw. scTNF Varianten (scTNF3x, scTNF4x) in serumhaltigem Medium bei Konzentrationen von 3,0 bis 0,01 ng/mL bei 37°C und 5% CO₂ für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Nachfolgend wurde die Funktionalität des löslichen sTNF bzw. der scTNF Varianten in Zytotoxizitäts-Tests auf Kym1-Zellen überprüft. Ausgehend von einer 3,0 ng/mL TNF-Probe wurden 1:3 Verdünnungen für den Test verwendet. Als Negativkontrolle wurde das oben beschriebene Kontroll-Bakterienlysatz eingesetzt. Es wurden Wildtyp-TNF und scTNF Verdünnungen frisch angesetzt und eingesetzt. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl Wildtyp-TNF als auch die scTNF Varianten starke zytotoxische Aktivität besaßen. Die ED₅₀-Werte liegen bei etwa 0,1 ng/ml für das Wildtyp-TNF und bei ca. 0,06 ng/mL für die scTNF Varianten. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysatz zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 8 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstest mit der humanen Zelllinie Kym1. Die Wildtyp-TNF und scTNF Lösungen wurden hierbei für 16 Tage im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Kym1-Zellen Zytotoxizitäts-Test durchgeführt. Es konnte eine deutliche Abnahme der Aktivität des sTNF nach 16 Tagen bei 37°C gemessen werden, wohingegen die Toxizität, d.h. die Bioaktivität, der scTNF Varianten annähernd gleich blieb. Für Wildtyp-TNF ergab sich ein ED₅₀ -Wert von ca. 1,2 ng/ml. Die scTNF Varianten blieben mit 0,06 ng/ml genauso aktiv wie die frisch angesetzten Proben. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysatz zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 9 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstest mit der humanen Zelllinie Kym1. sTNF und scTNF Lösungen wurden hierbei für 22 Tage im Zellinkubator inkubiert. Es konnte eine deutliche weitere Abnahme der Aktivität des sTNF nach 22 Tagen bei 37°C gemessen werden. Die scTNF Varianten waren nach wie vor stabil. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysatz zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Die nachfolgende **Tabelle 1** zeigt die Ergebnisdaten der Stabilitätstests gemäß Figuren 7 und 9 im Vergleich:

Tabelle 1: Vergleich der ED₅₀-Werte aus Figuren 7 + 9

	ED ₅₀ frisch titriert (Figur 7)	ED ₅₀ nach 22 Tagen (Figur 9)	Aktivitätsverlust
sTNF	0,1 ng/mL	1,50 ng/mL	>90%
scTNF	0,06 ng/mL	0,07 ng/mL	Kaum nachweisbar

Figur 10 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstest mit der humanen Zelllinie Kym1. Es wurden Verdünnungen aus 3 ng/ml nach 16 Tagen bei 37°C austitriert. Im Gegensatz zu den vorherigen Figuren 4 – 9 wurde in diesem Versuch eine Titrationskurve ausgehend von einer 16 Tage gelagerten 3 ng/mL TNF-Verdünnung angefertigt, während bei den vorherigen gezeigten Titrationskurven die jeweiligen Verdünnungen hergestellt und dann für die angegebene Zeit gelagert wurden. Es bleibt festzustellen, dass ein Vergleich der Daten aus Figur 8 (analoger Versuch mit 16 Tagen Inkubationszeit) und Figur 10 keine wesentlichen Unterschiede ergibt. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate zeigte erwartungsgemäß keinen toxischen Effekt.

Figur 11 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstests in humanem Serum. Um die Stabilität von Wildtyp-TNF und scTNF in humanem Serum zu testen, wurde in einem ersten Versuchsansatz das lösliche Wildtyp-TNF und die scTNF4x Variante in 100% Serum verdünnt und frisch austitriert. Als Ergebnis wurde für Wildtyp-TNF ein ED₅₀ -Wert von 0,004 ng/ml gemessen und für die scTNF Variante ein ED₅₀ -Wert von 0,007ng/ml.

Figur 12 zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstests in humanem Serum. Um die Stabilität von Wildtyp-TNF und scTNF in humanem Serum zu testen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz Wildtyp-TNF und die scTNF4x Variante in 100%igen frischem nicht-hitzeinaktivierten Serum für 8 Tage bei 37°C gelagert und anschließend auf Kym1 Zellen austitriert. Als Ergebnis wurde für Wildtyp-TNF ein ED₅₀ -Wert von 0,40 ng/ml gemessen und für die scTNF Variante ein ED₅₀ -Wert von 0,03 ng/ml. Die Auswirkungen der 8-tägigen Lagerung in 100%igem Serum stellten sich wie folgt dar: im Vergleich zum frisch austitrierten scTNF zeigte das 8 Tage gelagerte scTNF einen Aktivitätsverlust um den Faktor von ca. 4,3, wohingegen sich für das lösliche sTNF ein dramatischer Aktivitätsverlust um den Faktor 100 während der Lagerung in 100% Serum zeigte. Das erfindungsgemäße scTNF zeigte im Ver-

gleich zum sTNF demnach eine erheblich höhere Bioaktivität nach 8-tägiger Inkubation in Serum und erwies sich damit als sehr stabil in humanem Serum bei physiologischen Temperaturen.

- 5 In der nachfolgenden **Tabelle 2** sind die Daten der Ergebnisse aus den Figuren 11 und 12 noch einmal zur Verdeutlichung aufgeführt.

Tabelle 2: Vergleich der ED₅₀-Werte aus Figuren 11 + 12

	ED ₅₀ frisch titriert (Figur 11)	ED ₅₀ nach 8 Tagen (Figur 12)	Aktivitätsverlust
LöslichesTNF	0,004 ng/mL	0,40 ng/mL	100fach
Single chain TNF	0,007 ng/mL	0,03 ng/mL	4,3fach

- 10 **Figur 13** zeigt das Ergebnis einer Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Dargestellt ist ein Silbergel von aufgereinigtem Wildtyp-TNF und den aufgereinigten scTNF Varianten scTNF3x und scTNF4x. Die Proben wurden jeweils mit β -Mercaptoethanol (final 5%) bei 95°C für 5 min inkubiert. Auf das Silbergel wurden ca. 500 ng sTNF und scTNF4x und ca. 150 ng scTNF3x pro Spur auf-
- 15 getragen. Das Ergebnis des Silbergels der in einem 15%igem SDS-PAGE aufgetrennten scTNF Varianten zeigt, dass beide scTNF-Varianten auch unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa aufwiesen, das mit ihrer Struktur übereinstimmt. Fest-
- 20 zustellen ist auch, dass die unterschiedlichen Mengen der aufgetragenen Proteine scTNF3x und scTNF4x keinen Einfluss auf das Ergebnis hatten. Dies belegt die Stabilität der erfindungsgemäßen Proteine bzw. Polypeptide unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Das Ergebnis für sTNF hingegen zeigt, dass das Protein in seine Monomere von ca. 17 kDa zerfällt.

- Figur 14** zeigt das Ergebnis eines Stabilitätstest unter reduzierenden und denaturierenden
- 25 Bedingungen. In diesem Versuchsansatz wurde ein Western Blot der in einem 15%igem SDS-PAGE aufgetrennten Proben von Wildtyp-TNF und den scTNF Varianten scTNF3x und scTNF4x durchgeführt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, bei denen die Proben in einem Ansatz jeweils mit β -Mercaptoethanol (final 5%) bei 95°C für 5 min inkubiert wurden, während in dem anderen Ansatz keine β -Mercaptoethanol Inkubation erfolgte. Die

Detektion nach dem Lauf der Elektrophorese erfolgte mit einem AntiTNF-Antikörper. Als Ergebnis ist zu erkennen, dass der Antikörper das Protein beider scTNF Varianten in deutlichen Banden bei ca. 50 kDa spezifisch detektierte. Für Wildtyp-TNF wurde das Protein bei ca. 17 kDa spezifisch detektiert. Dieses belegt wiederum die Stabilität der erfindungsgemäßen scTNF3x und scTNF4x Varianten unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen und deckt sich ebenfalls erwartungsgemäß mit den Ergebnissen aus Figur 13.

Figur 15 zeigt das Ergebnis eines IkappaB-Degradations-Assays. IkappaB (I- κ B) ist ein Inhibitor des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B), der bekanntermaßen durch TNF der Degradierung zugeführt wird, wodurch NF- κ B aktiviert wird. Für den Nachweis der Degradation von I- κ B wurden Zell-Lysate 0, 30 und 60 Minuten nach Stimulierung mit jeweils 10 ng/ml Wildtyp-TNF, scTNF3x und scTNF4x hergestellt und nachfolgend im Western-Blot mit I- κ B-spezifischen Antikörpern analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die transiente Degradation von I- κ B sowohl von Wildtyp-TNF als auch von beiden scTNF Varianten induziert wurde, wobei das Reaktionsverhalten der scTNF Varianten dem des Wildtyp-TNF entsprach. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate (wie oben beschrieben ein nicht-scTNF exprimierendes Bakterienlysate, das identisch zu den rekombinanten scTNF-Proteinen prozessiert wurde) zeigte erwartungsgemäß keinen Effekt auf die I- κ B-Degradation.

20

Figur 16 zeigt das Ergebnis eines JNK-Assays. JNK (c-jun N-terminale Kinase) ist eine Stress-induzierte Kinase, welche durch TNF bekanntermaßen sehr stark aktiviert wird. Nach Stimulierung von Kym-1 Zellen für 0, 30 bzw. 60 Minuten mit jeweils 10 ng/ml Wildtyp-TNF, scTNF3x und scTNF4x wurden Zell-Lysate hergestellt und die JNK-Aktivität über Immunopräzipitation der JNK mit JNK-spezifischen Antikörpern und nachfolgendem Kinase-Assay mit GST c-Jun als Substrat überprüft. Das als Negativkontrolle eingesetzte Kontroll-Bakterienlysate (wie oben beschrieben) zeigte erwartungsgemäß keine Aktivierung der JNK-Kinase. Das Ergebnis zeigt, dass eine Aktivierung von JNK sowohl durch beide scTNF Variante als auch Wildtyp-TNF erfolgte, wobei das Reaktionsverhalten der scTNF Varianten dem des Wildtyp-TNF entsprach.

30

Figur 17 zeigt das Ergebnis eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). Einen weiteren typischen Nachweis für die Aktivität von TNF stellt die nach erfolgter Induktion der I- κ B-Degradation ablaufende Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern dar. Dazu wurden Zellkernpräparationen von nicht-stimulierten KYM-1 Kontrollzellen (Null
5 Minuten Stimulierung) bzw. von stimulierten Zellen (30 und 60 Minuten Stimulierung) hergestellt. Die Stimulierung der Zellen erfolgte jeweils mit Wildtyp-TNF, scTNF3x und scTNF4x. Der in den Zellkern translozierte Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde mit Hilfe von NF- κ B-spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotiden nachgewiesen. Das Ergebnis zeigt, dass NF- κ B in den Zellkern transloziert wurde. Dabei entspricht das Reaktionsverhalten der
10 scTNF Varianten dem des Wildtyp-TNF.

Figur 18 zeigt ein beispielhaftes Konstruktschema der erfindungsgemäßen Polypeptide, dargestellt anhand von TNF (als ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie). Die Bezeichnungen haben die folgenden Bedeutungen:

15 die Konstrukte AI/AII und BI/II weisen eine optimierte Codonusage für die Expression der Proteine in *E.coli* auf, und stellen Moleküle dar, die mit jeweils GlyGlyGlySer-Dreifachlinker bzw. Vierfachlinker verknüpft sind. Alle Moleküle tragen N-terminal einen Histidin-tag zur leichteren Anreinigung, die Moleküle BI/BII tragen zusätzlich eine kurze Aminosäurenkette
20 mit einem Cysteinrest zur gerichteten kovalenten Verknüpfung.

die Konstrukte C bis H sind geeignet für die Expression der Proteine in eukaryontischen Zellen, sie tragen N-terminal entsprechende Leitpeptidsequenzen.

25 sc = ist die Abkürzung für single chain,

cys = bezeichnet einen N-terminalen Peptidlinker mit internem Cystein für eine kovalente Kopplung,

30 L1_{long} bzw. L2_{long} = bezeichnet die Linker 1 bzw. 2, jeweils mit der Aminosäuresequenz (GGGS-GGGS-GGGS-GGGS) bzw. (GGGS)₄,

L1_{short} bzw. L2_{short} = bezeichnet die Linker 1 bzw. 2 jeweils mit der Aminosäuresequenz (GGGS-GGGS-GGGS) bzw. (GGGS)₃,

Leitpeptidsequenz = ist die Aminosäuresequenz für die Sekretion des Proteins aus eukaryon-
 5 tischen (Wirts-)Zellen.

scFv40 = steht für die Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40, das spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP ist,

10 AMAIZE = ist die Abkürzung für "Antibody-Mediated Apoptosis Inducing Zytokine" und

His/Flag-Tag = steht für die Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung der exprimierten Proteine

15 **Figur 19** zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF-L_{short} (Konstrukt A-II)

Merkmale Konstrukt A-II

- His-Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: Aminosäuren (nachfolgend in Figuren 19 bis 26 mit „AA“ abgekürzt) AA 5-10, Nukleotid (nachfolgend
 20 in Figuren 19 bis 26 mit „NT“ abgekürzt) NT 13-30
- Sequenz des humanen TNF Modul1 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 11-169, NT 31-507
- Sequenz des (GGGS)₃-Linker1: AA 170-181, NT 508-543
- 25 • Sequenz des humanen TNF Modul2 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 182-335, NT 544-1005
- Sequenz des (GGGS)₃-Linker2: AA 336-347, NT 1006-1041

- Sequenz des humanen TNF Modul3 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 348-501, NT 1042-1503
- Stopcodon: NT 1504-1506

5

Figur 20 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von cys- scTNF-L_{short} (Konstrukt B-II)

Merkmale Konstrukt B-II

- 10
- Aminosäure Cystein für kovalente Kopplung: AA 9, NT 25-27
 - His-Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA 15-20, NT 43-60
 - Sequenz des humanen TNF Modul1 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 21-181, NT 61-543
- 15
- Sequenz des (GGGS)₃-Linker1: AA 182-193, NT 544-579
 - Sequenz des humanen TNF Modul2 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 194-347, NT 580-1041
- 20
- Sequenz des (GGGS)₃-Linker2: AA 348-359, NT 1042-1077
 - Sequenz des humanen TNF Modul3 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls, Sequenz mit optimierter E.coli Codonverwendung): AA 360-513, NT 1078-1539
 - Stopcodon: NT 1540-1542

25

Figur 21 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scFasL (Konstrukt C)

Merkmale Konstrukt C

- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA1-15, NT 1-45
- Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA 19-26, NT 55-78
- Sequenz des humanen FasL Modul1 (extrazelluläre Domäne AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 30- 173, NT, 90-519
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 174-189, NT 520-567
- Sequenz des humanen FasL Modul2 (extrazelluläre Domäne AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 190- 332, NT 568-996
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 333-348, NT 997-1044
- Sequenz des humanen FasL Modul3 (extrazelluläre Domäne AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 349-491, NT 1045-1473
- Stopcodon: NT 1474-1476

Figur 22 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scTRAIL (Konstrukt D)

Merkmale Konstrukt D

- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA 1-15, NT 1-45
- Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA 19-26, NT 55-78
- Sequenz des humanen TRAIL Modul1 (extrazelluläre Domäne AA95-281 des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 30-216, NT 88-648
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 217-232, NT 649-696
- Sequenz des humanen TRAIL Modul2 (extrazelluläre Domäne AA95-281 des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 233-419, NT 697-1257

- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 420-435, NT 1258-1305
- Sequenz des humanen TRAIL Modul3 (extrazelluläre Domäne AA95-281 des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 436-622, NT 1306-1866
- Stopcodon: NT 1861-1863

5

Figur 23 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF (Konstrukt E)

Merkmale Konstrukt E

- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA 1-15, NT 1-45
- Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins:: AA 19-26, NT 55-78
- Sequenz des humanen TNF Modul1 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA30-184 , NT 88-552
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 85-200, NT 553-600
- Sequenz des humanen TNF Modul2 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA 201-355, NT 601-1065
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 356-371, NT 1066-1113
- Sequenz des humanen TNF Modul3 (extrazelluläre Domäne des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA 372-526, NT 1114-1581
- Stopcodon: NT 1799-1581

Figur 24 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scFasL-AMAIZe (Konstrukt F)

Merkmale Konstrukt F

- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA 1-19, NT 1-57

- Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: AA 20-267, NT 58-801
 - Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA278-285, NT 832-855
- 5
- Sequenz des humanen FasL Modul1 (extrazelluläre Domäne, AA 139 -281, des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 290-432, NT 868-1296
 - Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 433-448, NT 1297-1344
 - Sequenz des humanen FasL Modul2 (extrazelluläre Domäne, AA 139-281, des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 449-591, NT 1345-1773
- 10
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 592-607 , NT 1774-1821
 - Sequenz des humanen FasL Modul3 (extrazelluläre Domäne, AA 139-281, des natürlichen, humanen FasL Moleküls): AA 608-750, NT 1822-2250
 - Stopcodon: NT 2251-2253
- 15
- Figur 25** zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scTRAIL-AMAIze (Konstrukt G)
- Merkmale Konstrukt G
- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA 1-19, NT 1-57
- 20
- Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: AA 20-267, NT 58-801
 - Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA278-285, NT 832-855
- 25
- Sequenz des humanen TRAIL Modul1 (extrazelluläre Domäne, AA95-281, des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 289-475, NT 865-1426
 - Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 476-491, NT 1427-1476
 - Sequenz des humanen TRAIL Modul2 (extrazelluläre Domäne, AA95-281, des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 492-678, NT 1477-2034

- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 679-694, NT 2035-208
- Sequenz des humanen TRAIL Modul3 (extrazelluläre Domäne, AA95-281, des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): AA 695-, NT 2083-2643
- Stopcodon: NT 2644-2646

5

Figur 26 zeigt die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF-AMAIze (Konstrukt H)

Merkmale Konstrukt H

- Leitpeptidsequenz für Sekretion des Proteins in eukaryontischen Zellen: AA 1-19, NT 1-57
- Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: AA 20-267, NT 58-801
- Flag Tag Peptidsequenz zur Affinitätsreinigung des gebildeten Proteins: AA 278-285, NT 832-855
- Sequenz des humanen TNF Modul1 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA 289-443, NT 865-1329
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker1: AA 444-, NT 1330-1377
- Sequenz des humanen TNF Modul2 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA 460-614, NT 1378-1842
- Sequenz des (GGGS)₄-Linker2: AA 615-630, NT 1843-1890
- Sequenz des humanen TNF Modul3 (extrazelluläre Domäne, AA 79-181, des natürlichen, humanen TNF Moleküls): AA 631-785, NT 1891-2353
- Stopcodon: NT 2356-2358

Figur 27 zeigt die Pharmakokinetik von humanem Wildtyp-TNF und humanem scTNF (vgl. Beispiel 2). Die Daten in Figur 27 zeigen einen klaren Anstieg der *in vivo* Halbwertszeit der scTNF Varianten. Es wird für scTNF damit gegenüber TNF eine deutlich erhöhte Wir-

kungsdauer in vivo erwartet, was damit den Wert von scTNF, insbesondere von scTNF-L₂, als potentiellles Therapeutikum unterstreicht.

Figur 28 zeigt kovalent an Partikel (Silica) gekoppeltes CysHis-scTNF. Dieses kovalent gekoppelte CysHis-scTNF ist bioaktiv und besitzt die besondere Aktivität von membrangebundenem TNF, i.e. es aktiviert TNFR2. Figur 28 zeigt, daß Zellen aus Mausfibroblasten, die mit dem Konstrukt TNFR2-Fas transfiziert sind und mit seriellen Verdünnungen der angegebenen Reagenzien behandelt wurden, völlig resistent gegen lösliches wtTNF sind. Nach kovalenter Kopplung von reduziertem CysHis-scTNF an Silica- Micropartikel (beads) nach etablierten Protokollen (DPA 2001, Nr. DE10144252) bewirken diese eine starke zytotoxische Antwort (Kreis), ähnlich wie eine Positivkontrolle bestehend aus CysHis-scTNF und einem TNFR2 vernetzenden Antikörper, mAk 80M2 (Dreieck). Nicht gekoppeltes Cys-His scTNF zeigt erwartungsgemäß keine Aktivität auf TNFR2 positiven Zellen (Quadrate).

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend durch die Beispiele illustriert:

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung verschiedener erfindungsgemäßer Polypeptid-Konstrukte

Alle Klonierungen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Im Folgenden werden die Bedingungen dieser aufgeführt.

Standard-PCR:

60 ng Template, 0,5 µl 100 µM Primer, 1 µl 10 mM dNTPs sowie 5µl 10x Puffer und 2 U

Taq-Polymerase wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit folgendem PCR-Programm amplifiziert. Denaturierung: 94°C 3 min; 15 Zyklen: Denaturierung 94°C 30s, Annealing 55°C 30s, Elongation 72°C 90s; finale Elongation: 72°C 7 min.

Verdau von PCR Produkten:

Das PCR-Produkt wurde über ein Agarose Gel aufgereinigt und eluiert und nachfolgend mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (s. genaue Angaben) in einem 40 µl Reaktionsansatz bei optimaler Spalttemperatur (wird vom Hersteller angegeben) für 2 Stunden verdaut.

Verdau von Vektoren:

1µg Vektor wurde mit 5U der entsprechenden Restriktionsenzyme in einem 20 µl Reaktionsvolumen für 2 Stunden bei optimaler Spalttemperatur (diese ist abhängig vom verwendeten Enzym und wird vom Hersteller angegeben) verdaut. Zur Dephosphorylierung von Vektoren wurde 10 U Alkalische Phosphatase für 1 Stunde zu dem Reaktionsverdau gegeben.

5 „Fill in“-Reaktion:

Der Ansatz eines Vektorverdaus wurde mit 33 µM dNTPs und 1U/1µg DNA Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I versetzt und 15 min bei 25°C inkubiert. Diese Reaktion wurde mit 10 mM EDTA für 20 min bei 75°C gestoppt.

Ligation:

- 10 Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 zusammen mit 400 U Ligase in einem 10 µl Volumen über Nacht bei 16°C ligiert.

I. Herstellung von scTNF_{human} (scTNF) mit vier- oder dreifach Linkern:

- Es wurden zwei scTNF Varianten hergestellt, die sich durch die Länge des Peptid-Linkers zwischen den einzelnen Modulen unterscheiden. Es wurden Primer mit 4fach bzw. 3fach Peptid-Linker-Sequenz eingesetzt: Linker_{long} mit (GGGS)₄- oder Linker_{short} mit (GGGS)₃- Sequenz. Die erzeugten Konstrukte enthielten demnach entweder nur zwei 4fach Linker (L1 oder L2 mit (GGGS)₄- als „long“ bezeichnet) oder nur zwei 3-fach Linker (L1 oder L2 mit (GGGS)₃- mit „short“ bezeichnet).

- 20 1. Mit den Primern V und I bzw. II (für Linker_{long}) und dem pQE-9 Vektor mit einem TNF Modul (pQE9-HisTNF) als Template wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Der Vektor trägt eine His Tag Sequenz zur späteren Affinitätsaufreinigung des produzierten Proteins.
- 25 2. Das erhaltene PCR-Produkt I wurde nachfolgend mit 20 U der jeweiligen Restriktionsenzyme StuI und HindIII bei 37°C verdaut. Der gleiche Verdau sowie eine Dephosphorylierungsreaktion wurde mit dem pQE9-HisTNF Vektor durchgeführt und durch eine Ligation das PCR-Produkt I in den pQE9-HisTNF Vektor eingebracht. Ergebnis dieses Schrittes war ein His Tag - TNF Modul1 mit einem Linker_{1short bzw. long} bzw. folgendes Konstrukt im pQE9-Vektor:

- 30 **EcoRI- His Tag - TNF Modul1 -Linker_{1short bzw. long} - BamHI**

3. Über eine weitere PCR mit den Primern III und I bzw. II (für Linker_{long}) und dem pQE9-HisTNF Vektor als Template wurde das PCR-Produkt II erzeugt. Das PCR-Produkt II wurde nachfolgend mit jeweils 20 U der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII geschnitten und in den pQE9-HisTNF Vektor, der mit den gleichen Enzymen geschnitten und dephosphoryliert wurde, eingebracht. Ergebnis dieser Klonierung war ein pQE9-Vektor, der wie folgt aussah:

TNF Modul2- Linker2_{short bzw. long} - BamHI

Dieses Konstrukt trägt keine Sequenz für einen His-Tag vor der TNF Sequenz.

4. Das klonierte PCR-Produkt II aus Schritt 3 wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym Hind III und nachfolgend partiell mit BamHI (1 U/μg DNA) aus dem Vektor herausgeschnitten. Der pQE9-His Tag TNF Modul1-Linker1_{short bzw. long} Vektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII sequentiell geschnitten, dephosphoryliert und das PCR-Produkt II in diesen Vektor ligiert. Ergebnis war ein pQE9-Vektor mit folgendem Konstrukt:

His Tag - TNF Modul1 -Linker1_{short bzw. long} -TNF Modul2 -Linker2_{short bzw. long}

5. Mit dem pQE9-HisTNF-Vektor als Template und den Primern III und IV wurde eine weitere PCR unter Standardbedingungen durchgeführt und das erhaltene PCR-Produkt III mit den Restriktionsenzymen BamHI (40U) und HindIII (40U) sequentiell verdaut. Dieses Fragment wurde dann in einen pBluescript SKII Vektor, der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geschnitten wurde, ligiert. Ergebnis dieser Klonierung war ein pBluescript SKII Vektor, der das TNF Modul 3 ohne Linker enthält.

6. Der pQE9- Vektor mit dem **His Tag - TNF Modul1 -Linker1_{short bzw. long} -TNF Modul2 -Linker2_{short bzw. long}** Konstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, anschließend wurde dieser Vektor mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E. coli behandelt, um ein „fill in“ vorzunehmen. Nach diesem Schritt wurde ein partieller Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI (1 U/μg DNA) durchgeführt.

7. Parallel zum Schritt 6. wurde der pBluescript SKII Vektor, der das TNF Modul 3 enthält, mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten, anschließend wurde dieser Vektor mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E. coli behandelt, um ein „fill in“ vorzunehmen. Nach diesem Schritt wurde ein zweiter Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI unter Standardbedingungen mit zusätzlicher Dephosphorylierung durchgeführt.

8. Das durch den Restriktionsverdau erhaltene Fragment aus Schritt 6. wurde nachfolgend in den im Schritt 7 generierten linearem Vektor ligiert. Die Konstrukte lagen in reverser Anordnung wie folgt gezeigt vor:

HindIII- TNF Modul3- Linker2_{short bzw. long}-TNF Modul2-Linker1_{short bzw. long}-TNF Modul1-
His Tag –EcoRI

9. Das reverse liegende TNF- Konstrukt aus Schritt 8. wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII aus dem pBluescript SKII Vektor herausgeschnitten und in dem mit den gleichen Enzymen behandelten sowie dephosphorylierten pQE9-HisTNF Vektor ligiert. Hierdurch entstand folgendes Konstrukt mit dem vollständigen scTNF in korrekter Orientierung:

EcoRI- His Tag-TNF Modul1-Linker1_{short bzw. long}-TNF Modul2- Linker2_{short bzw. long}-
TNF Modul3- HindIII

10. Zur Herstellung eines scTNF mit einem N-terminalen Cystein wurden die Oligos cys-scTNF VI und VII annealed (je 20µl 100µM Oligo VI bzw VII wurden zusammen für 5 min bei 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen) und so das Oligo1 gebildet. Es wurde das Konstrukt aus Punkt 9 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BbsI verdaut und das Oligo1, welches über die gleichen Schnittstellen verfügt, in den Vektor ligiert. . Alternativ wurde das Cystein über PCR-Mutagenese eingefügt. Ergebnis dieser Klonierung war folgendes Konstrukt:

EcoRI- Cystein - His Tag - TNF Modul1-Linker1_{short bzw. long}- TNF Modul2- Lin-
ker2_{short bzw. long}- TNF Modul3- HindIII

- Alle Konstrukte wurden mittels Sequenzierung verifiziert.

Die Expression erfolgte im *E.coli* Stamm XL-1 blue. Die Aufreinigung der exprimierten scTNF Varianten erfolgte mit Hilfe chromatographischer Methoden (His Tag Affinitäs- und Anionenaustauscherchromatographie).

Nachfolgend werden die Sequenzen der verwendeten Primer angegeben:

Peptid-Linker Sequenzen auf Proteinebene

3fach GGGS-Linker (short) = (GGGS)₃: GGGS GGGS GGGS

4fach GGGS-Linker (long) = (GGGS)₄: GGGS GGGS GGGS GGGS

5

Peptid-Linker Sequenzen auf Nukleotidebene

3fach GGGS-Linker (short): 5'GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC
GGA TCC3'

10 4fach GGGS-Linker (long): 5'GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC
GGT TCT GGT GGC GGA TCC3'

Primer für die Klonierungen15 **scTNF Primer I**

5'- TCG ATT AAG CTT CCC GGG GGA TCC GCC ACC AGA ACC GCC ACC AGA
ACC GCC ACC CAG AGC GAT GAT ACC GAA GTA AAC CTG ACC -3'

scTNF Primer II

20 5'- ATC GAT TAA GCT TCC CGG GGG ATC CGC CAC CAG AAC CGC CAC CAG
AAC CGC CAC CAG AAC CGC CAC CCA GAG CGA TGA TAC CGA AGT AAA CCT
GAC C -3'

scTNF Primer III

25 5'- CCC CGA ATT CGG ATC CTC TTC TCG TAC CCC GTC TGA CAA ACC G -3'

scTNF Primer IV

5'- GGG GGG GAA GCT TAT CGA TAG TTA GAT ATC ATC ACA GAG CGA TGA
TAC CGA AG -3'

30

scTNF Primer V

5'- CCT GTA CCT GAT CTA CTC CCA GGT TCT GTT CAA AGG CCA GG -3'

Oligo für CysHis-Insertion :

cys-scTNF Primer VI

AAT TCA TTA AAG AGG AGA AAT TAA CTA TGG GAG AGC TCA TCG AAG
 5 GTC GCT GCG CCG GTG GAT CTG GTC ATC ATC ATC ACC ATC ACG GCT CAG
 ACG G

cys-scTNF Primer VII

CGC TCC GTC TGA GCC GTG ATG GTG ATG ATG ATG ACC AGA TCC ACC
 10 GGC GCA GCG ACC TTC GAT GAG CTC TCC CAT AGT TAA TTT CTC CTC TTT
 AAT G

II. Herstellung von scFasL in pcDNA3 und AMAIZE-Konstrukte:

15 Für nachfolgende Klonierungen wurden die unter Beispiel 1 angegebenen Standardbedingungen verwendet.

A. Generierung vom HA-Signal in pcDNA3

1. Verdau des pcDNA3-Vektors mit KpnI und NotI.
- 20 2. Herstellung des HA-Oligo mit KpnI-HA-Signal-NotI-Sequenz über Annealing der Primer HA-IF und HA-IIR für Leitpetidsequenz:
3. Ligation des HA-Oligos (enthält KpnI und NotI- Schnittstelle) in den pcDNA3-Vektor

B. Herstellung des scFasL im pcDNA3(+)- Vektor

- 25 1. PCR mit Primer FasL#1F und FasL#2R auf Template FasL-AMAIZE-Vektor. Die Herstellung dieser Art von Konstrukten werden in der Patenanmeldung DE 10045591.3 beschrieben, die hiermit vollinhaltlich zum Offenbarungsgehalt der vorliegenden Erfindung gemacht wird. Produkt dieser PCR 1 war ein **NotI - Flag Tag - FasL Modul1-Linker1-BamHI-XbaI** Konstrukt.
- 30 2. Über die NotI und XbaI Restriktionsschnittstelle wurde dieses Konstrukt in den mit den gleichen Enzymen verdauten pcDNA3-HA Sequenz Vektor kloniert, so dass folgendes

Konstrukt entsteht:

HA Sequenz - Flag Tag - FasL Modul1 - Linker1 - BamHI - XbaI

3. Mit Hilfe einer weiteren PCR auf dem Template FasL-AMAIZE Vektor und den Primern FasL#3 und FasL#1 wurde folgendes PCR-Produkt 2 generiert:

5 **blunt end- FasL Modul2 – Linker2 – BamHI – XbaI**

4. Im nächsten Schritt wurde der pcDNA3 Vektor aus Punkt 2 mit BamHI verdaut, diese Schnittstelle mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und nachfolgend mit XbaI geschnitten, so dass ein „blunt end“ und ein „sticky end“ entstand. In diesen so modifizierten Vektor wurde anschließend das PCR-Produkt 2 kloniert, wodurch folgendes Konstrukt gebildet wurde:

10 **HA Sequenz - Flag Tag - FasL Modul1 - Linker1-FasL Modul2- Linker2- BamHI - XbaI**

5. Für das dritte Modul wurde eine weitere PCR mit dem Template FasL-AMAIZE Vektor und den Primern FasL#4 und FasL#5 durchgeführt. Das gebildete PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor aus Punkt 4 ligiert. Resultat dieser Klonierung war folgendes Konstrukt im pcDNA3 Vektor:

15 **HA Sequenz - NotI - Flag Tag - FasL Modul1 - Linker1-FasL Modul2- Linker2- FasL Modul3 - stop -XbaI.**

20

Für die Herstellung der scFasL- bzw. scTNF-AMAIZE Konstrukte wurden die jeweiligen scFasL bzw. scTNF mit den Restriktionsenzymen NotI bzw. EcoRI und XbaI verdaut und die Inserts als Kasette in die entsprechenden AMAIZE-Vektoren (siehe Patentanmeldung DE 10045591.3) eingefügt, wobei diese Vektoren ebenfalls mit den Enzymen NotI bzw. EcoRI und XbaI geschnitten wurden. Hierüber wurden folgende Konstrukte hergestellt:

25

Leitpeptid-scFv40-Flag Tag- FasL Modul1-Linker1-FasL Modul2-Linker2- FasL Modul3

Leitpeptid-scFv40-Flag Tag- TNF Modul1-Linker1-TNF Modul2-Linker2- TNF Modul3

30

Nachfolgend werden die Sequenzen der verwendeten Primer angegeben:

FasL#1R:

5'ATCGATTTCTAGACCCGGGGGATCCGCCACCAGAACCGCCACCAGAACCGCC
5 ACCAGAACCGCCACCGAGCTTATATAAGCCGAAAAACGTCTGAGATTTC3'

FasL#2F:

5'GGGGTAGCGGCCGCGCTGTCGACGATTACAAAGAC3'

10 FasL#3F:

5'AGAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGG3'

FasL#4F:

5'GGGGCGGATCCGAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGG3'

15

FasL#5R:

5'GGGGCCTCTAGAATCGATGGTCAGAGCTTATATAAGCCGAAAAACGTCTG3'

HA-IF

20 5'CGCCAT GGCTATCATC TACCTCATCC TCCTGTTTAC CGCTGTGCGG
GGAGC3'

HA-IIR

5'GGC CGC TGC CCC GCA CAG CGG TGA ACA GGA GGA TGA GGT AGA TGA
25 TAG CCA TGG CGG TAC3'

III. scTRAIL-Klonierung und Herstellung von scTRAIL AMAIZe Konstrukten

Für nachfolgende Klonierungen wurden die unter Beispiel 1 angegebenen Standardbedingun-
30 gen verwendet.

1. PCR mit Primern TRAIL#1 und TRAIL#2 auf Template pcDNA3-sc40-TRAIL (siehe Patenanmeldung DE 10045591.3). PCR-Produkt 1 wurde mit EcoRI und XbaI geschnit-

ten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten pcDNA3-scFasL Vektor ligiert. Dieser Verdau deletierte die FasL Sequenz, wobei die HA- und die Flag Tag Sequenz erhalten blieb und nun folgendes Konstrukt entstanden war:

HA-Sequenz – Flag Tag – TRAIL Modul1 – Linker1- BamHI – XbaI

- 5 2. Mit Hilfe der Primer TRAIL#1R und TRAIL#2F wurde mit dem Template TRAIL-AMAIze (siehe. Patentanmeldung DE 10045591.3) das PCR-Produkt 2 generiert. Dieses wurde nur mit XbaI geschnitten, wobei ein blunt-end und ein sticky-end entsteht. Das Konstrukt aus Punkt 1 wurde mit BamHI verdaut und nachfolgend mit dem Klenow-Enzym behandelt, so dass die Enden aufgefüllt wurden. Im Anschluß daran wurde ein
- 10 XbaI Verdau durchgeführt und das PCR-Produkt 2 in diesen Vektor kloniert. Ergebnis war folgendes Konstrukt:

HA-Sequenz – Flag Tag – TRAIL Modul1 – Linker1 – TRAIL Modul2 – Linker2 - BamHI – XbaI

- 15 3. Für die Klonierung des TRAIL Moduls 3 wurde eine PCR mit den Primern TRAIL#4 und TRAIL#5 auf dem Template TRAIL-AMAIze durchgeführt, das Produkt nachfolgend mit BamHI und XbaI verdaut und in das Konstrukt aus Punkt 2 – ebenfalls mit BamHI und XbaI verdaut- kloniert, wodurch folgendes Konstrukt entstanden ist:

HA-Sequenz – Flag Tag – TRAIL Modul1 – Linker1 – TRAIL Modul2 – Linker2 – TRAIL Modul3 Stop – XbaI

20

Für die Herstellung der scTRAIL-AMAIze Konstrukte wurden die jeweiligen scTRAIL Vektoren mit den Restriktionsenzymen NotI bzw. EcoRI und XbaI verdaut und die Inserts als Kassette in die entsprechenden AMAIze-Vektoren (siehe. Patentanmeldung DE 10045591.3), wobei diese Vektoren ebenfalls mit den Enzymen NotI bzw. EcoRI und XbaI

25 geschnitten wurden. Hierüber wurden folgende Konstrukte hergestellt:

HA-svFv40-Flag Tag- TRAIL Modul1-Linker1-TRAIL Modul2-Linker2- TRAIL Modul3

Nachfolgend werden die Sequenzen der verwendeten Primer angegeben:

Primer für die scTRAIL Klonierung

TRAIL#1R:

5'ATCGATTCTAGACCCGGGGGATCCGCCACCAGAACCGCCACCAGAACCGCC
 ACCAGAACCGCCACCGCCAACTAAAAAGGCCCCGAAAAAACTGGCTT-
 5 CATGGTC3'

TRAIL#2F:

5'GGGGTAGAATTCGGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAG3'

10 TRAIL#3F:

5'AACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAG3'

TRAIL#4F:

5'GGGGCGGATCCACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAG3'

15

TRAIL#5R:

5'GGGGCCTCTAGAATCGATGGTCAGCCAACTAAAAAGGCCCCGAAAAAACTGG
 C3'

20 Beispiel 2: Pharmakokinetik von humanem Wildtyp-TNF und humanem scTNF.

6 Wochen alte Balb/c Mäusen wurden i.v. mit 12 µg TNF oder sc TNF (jeweils 3 Mäuse) injiziert. Alle 45 min. wurde Blut abgenommen, gesammelt und die Konzentration von TNF im Serum wurde mittels eines humanen TNF spezifischen ELISA Kits bestimmt. Die Daten
 25 in Figur 27 zeigen einen klaren Anstieg der *in vivo* Halbwertszeit der scTNF Varianten. Es wird daher für scTNF erwartet, daß es eine deutlich erhöhte biologische Wirkdauer *in vivo* besitzt, was damit den Wert von scTNF als potentielles Therapeutikum unterstreicht.

Beispiel 3: Kovalent an Partikel (Silica) gekoppeltes CysHis-scTNF.

30

Mausfibroblasten, die mit dem Konstrukt TNFR2-Fas transfiziert sind, wurden mit seriellen Verdünnungen der angegebenen Reagenzien behandelt. Diese Zellen sind völlig resistent ge-

gen lösliches wtTNF. Nach kovalenter Kopplung von reduziertem CysHis-scTNF an Silica-Micropartikel (beads) nach etablierten Protokollen (DPA 2001, Nr. DE10144252) bewirken diese eine starke zytotoxische Antwort (Kreis), ähnlich wie eine Positivkontrolle bestehend aus CysHis-scTNF und einem TNFR2 vernetzenden Antikörper, mAk 80M2 (Dreieck).

5 Nicht gekoppeltes Cys-His scTNF zeigt erwartungsgemäß keine Aktivität auf TNFR2 positiven Zellen (Quadrat). Kovalent gekoppeltes CysHis-scTNF ist bioaktiv und besitzt die besondere Aktivität von membrangebundenem TNF, i.e. es aktiviert TNFR2.

Beispiel 4: Vergleich von Standard rekombinantem humanen (rh)TNF und scTNF in *in vivo* Tumornekrose- Modellen und *in vitro* L929-Zytotoxizitäts-Aktivität

Mäuse: C3H/HeJ (weiblich), 17 – 19 g von Charles River

Tumor Zellen: CFS-1 Methylcholanthrene-induzierte Fibrosarkomazelllinie aus C3H/HeN abgeleitet aus Maus (Referenz: Hafner M., P. Orosz, A. Krüger, und D.N. Männel. 1996 TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity. *Internat. J. Cancer* 66:388-392);

Tumornekrose Experiment: Die Mäuse erhielten 1.6×10^7 CFS-1 Zellen in 50 µl Medium (RPMI, 10% FCS) intradermal in den Rücken; Die Tumore ließ man 12 Tage wachsen, bis sie eine Größe von etwa 5-6 mm Durchmesser, vor der intraperitonealen Injektion mit TNF (10 µg pro Maus) in 200 µl PBS oder PBS alleine als Kontrolle, erreichten. Die Tumorgöße wurde täglich gemessen und makroskopisch untersucht. Die Mäuse wurden am 6. Tag nach der Behandlung getötet und die Tumore für die Histologie entfernt. Die Tumore wurden herausgeschnitten, über Nacht in 4% PBS-gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Equatoriale Vertikalschnitte (4µm) wurden mit Hematoxin und Eosin gefärbt und mikroskopisch auf Nekrose untersucht (wie z.B. beschrieben in: Lucas R. et al., 2001, *Int J Cancer*, 91:543-549).

TNF: rhTNF spezifische Aktivität 6.6×10^6 U/mg (48 h L929 Test ohne Act D)
scTNF

In vitro Experiment, LD50 Aktivität im L929 Zytotoxizitätsassay mit Act.D für:

rhTNF = 391 pg/ml

scTNF = 39 pg/ml

(getestet mit den gleichen TNF Proben, die für *in vivo* Experimente eingesetzt wurden)

scTNF zeigt in diesem *in vitro* Experiment eine 10-fach erhöhte Aktivität.

5

In vivo Tumor Nekrose Experiment:

Gruppe	n	Tumordurchmesser		Nekrose		
		d0	d4	makroskopisch*	mikroskopisch**	
					<5%	>10%
PBS	6	5.2+1	7.4+0.5	1	2	0
rhTNF	7	5.2+0.9	6.6+1.7	3	6	1
scTNF	7	5.9+0.5	7.3+0.3	5	0	7

15

* = makroskopisch klar erkennbare oberflächliche Nekrose

** = bei mikroskopischer Untersuchung zentrale hämorrhagische Nekrose, <5% oder >10% des Tumorgewebes

Schlußfolgerung:

Nach 4 Tagen Behandlung mit Einzeldosen wurde kein Unterschied in der Tumorgroße festgestellt (einen Überblick über TNF als Tumorthapeutikum siehe z.B. Eggermont et al, Lancet Oncol. 4.429 (2003)).

rhTNF induzierte kleine hämorrhagische Nekrosen (<5% des Tumorareals), makroskopisch nur in 3/7 der Tiere zu sehen.

scTNF induziert größere hämorrhagische Nekrosen (> 10% des Tumorareals) in allen Tumoren (7/7), 5/7 davon sind makroskopisch zu sehen.

scTNF >> rhTNF in Bezug auf Tumorzytotoxizität *in vitro* und Induktion von Nekrose.

30

Patentansprüche

5

1. Polypeptid umfassend mindestens drei Komponenten A und mindestens zwei Komponenten B, wobei jede Komponente A ein Monomer eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder ein funktionelles Fragment und/oder eine funktionelle Variante hiervon ist und jede Komponenten B ein Peptid-Linker ist.

10

2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, wobei die Komponenten A identisch oder verschieden sind.

15

3. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten A aus dem gleichen Organismus oder verschiedenen Organismen stammt/stammen.

20

4. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten A ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus FasL, TRAIL, TNF, CD30L, CD40L, OX40L, RANKL, TWEAKL, LTalpha, LTbeta, LIGHT, CD27L, 41-BB, 41BBL, GITRL, APRIL, EDA, VEGI und BAFF.

25

5. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten B jeweils zwei der mindestens drei Komponenten A miteinander verknüpfen.

6. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei mindestens eine der Komponenten B die Aminosäuresequenz (GGGS)₃ oder (GGGS)₄ aufweist.

30

7. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten A und die Komponenten B ein trimere Proteinstruktur ausbilden.

8. Polypeptid gemäß Anspruch 7, wobei die Komponenten A und die Komponenten B eine homotrimere Proteinstruktur ausbilden.

9. Polypeptid gemäß Anspruch 7, wobei die Komponenten A und die Komponenten B eine heterotrimere Proteinstruktur ausbilden.
- 5 10. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten B identisch oder verschieden sind.
11. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komponenten B aus dem gleichen Organismus oder verschiedenen Organismen stammt/stammen.
- 10 12. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Polypeptid eine vorzugsweise N-terminale Tag-Sequenz, insbesondere eine His-Tag-Sequenz oder eine Flag-Tag-Sequenz, aufweist.
- 15 13. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Polypeptid eine vorzugsweise N-terminale Leitpeptidsequenz aufweist.
14. Polypeptid gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Polypeptid mindestens eine weitere Komponente C enthält, die ein Antikörperfragment oder ein anders Protein oder Peptid ist, welches ein spezifisches Zielmolekül auf einer Zelloberfläche selektiv erkennt.
- 20 15. Polypeptid gemäß Anspruch 14, wobei die Komponente C ein Antikörperfragment eines Säugetiers, insbesondere murinen oder humanen Ursprungs, oder ein humanisiertes Antikörperfragment ist.
- 25 16. Polypeptid gemäß Anspruch 14 oder 15, wobei das Antikörperfragment in verschiedenen Antikörperformaten vorliegen kann, z.B. als scFv, insbesondere scFv40.
- 30 17. Polypeptid gemäß Anspruch 14, wobei die Komponente C ein Protein oder Peptid mit Spezifität für ein Zelloberflächenmolekül, insbesondere einen Zytokinrezeptor, ein Wachstumsfaktorrezeptor, ein Integrin oder Zelladhäsionsmolekül ist.

18. Polypeptid gemäß Anspruch 17, wobei der Zytokinrezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe der TNFR Genfamilie,.

5

19. Nukleinsäure, kodierend für ein Polypeptid gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 18.

20. Vektor, enthaltend die Nukleinsäure gemäß Anspruch 19.

10

21. Wirtszelle, enthaltend die Nukleinsäure gemäß Anspruch 19 und/oder den Vektor gemäß Anspruch 20.

22. Verfahren zur Herstellung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 21, umfassend die folgenden Schritte:

15

- a. Herstellen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 19 oder eines Vektors gemäß Anspruch 20, und
- b. Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt (a) in eine Zelle.

20

23. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 umfassend die folgenden Schritte:

25

- a. Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 21 unter geeigneten Bedingungen,
- b. Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 19 unter geeigneten Bedingungen, und
- c. Isolieren des Polypeptids aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand.

30

24. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 20, eines Vektors gemäß Anspruch 20 oder einer Wirtszelle gemäß Anspruch 21 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Er-

krankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, virale Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

5

25. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 19, eines Vektors gemäß Anspruch 20 oder einer Wirtszelle gemäß Anspruch 21 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Erkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, virale Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

10

15

26. Pharmazeutische Zusammensetzung, mindestens enthaltend ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 und/oder einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 19 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 20 und/oder eine Wirtszelle gemäß Anspruch 21 sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder Trägersubstanzen.

20

27. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 26 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, hyperproliferatorische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Erkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD, virale Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen.

25

30

28. Verfahren zur extrakorporalen Manipulation, Depletion und/oder Entfernung löslicher, suspendierter Bestandteile oder zellulärer Bestandteile des Blutes umfassend die folgenden Schritte:

- 5 a) Gegebenenfalls Auftrennung des Blutes in eine oder mehrere Fraktionen mit festen und/oder flüssigen Bestandteilen;
- b) Bindung von löslichen, suspendierten oder zellulären Bestandteile des Blutes an eine mit einem Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 gekoppelte Oberfläche oder Partikel; und
- 10 c) Gegebenenfalls Abtrennung der gebundenen löslichen, suspendierten oder zellulären Bestandteile des Blutes.

29. Verfahren gemäß Anspruch 28, wobei vor Schritt a) oder b) eine Blutentnahme an einem Patienten durchgeführt wird.

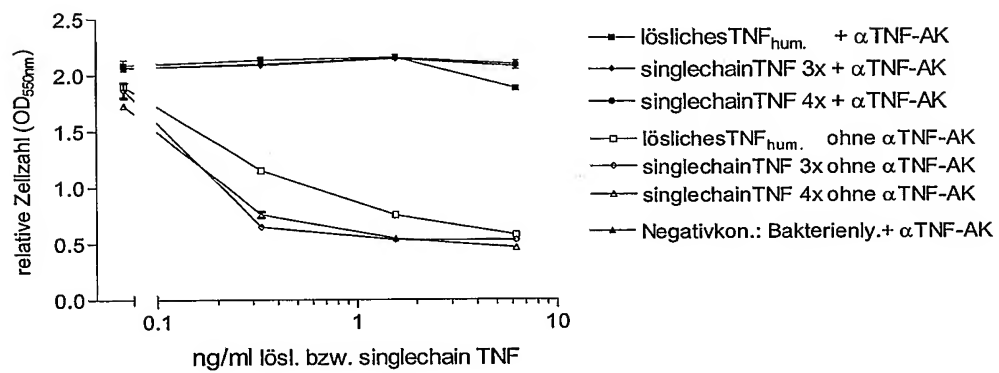
15

30. Verfahren gemäß Anspruch 28, wobei nach Schritt b) oder c) das so behandelte Blut oder die Blutfraktion einem Patienten wieder reinjiziert wird.

20

1/41

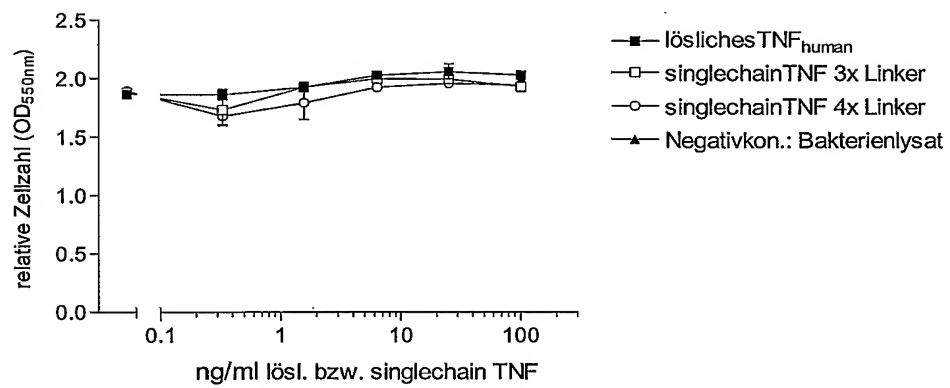
Zytotoxizitätstest sTNF und scTNFs mit neutralisierendem AK



Figur 1

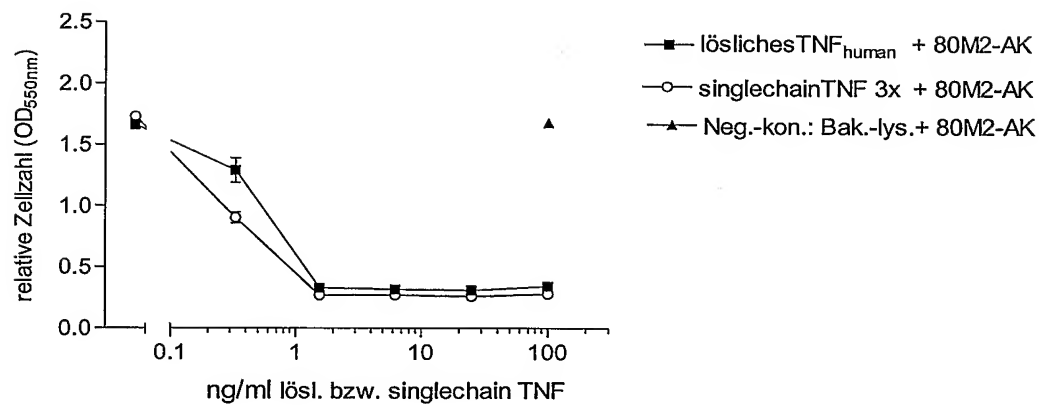
2/41

**Zytotoxizitätstest
sTNF und scTNFs auf MF-TNFR2**

**Figur 2**

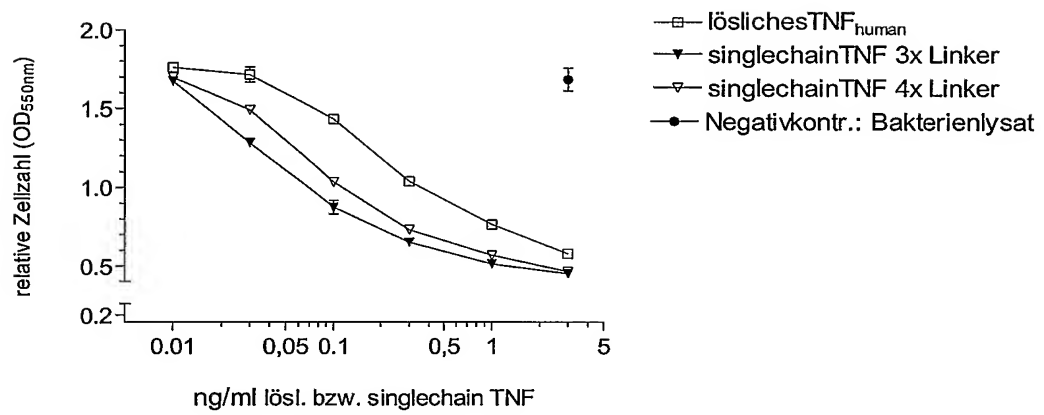
3/41

Zytotoxizitätstest
sTNF und scTNFs auf MF-TNFR2 + 80M2

**Figur 3**

4/41

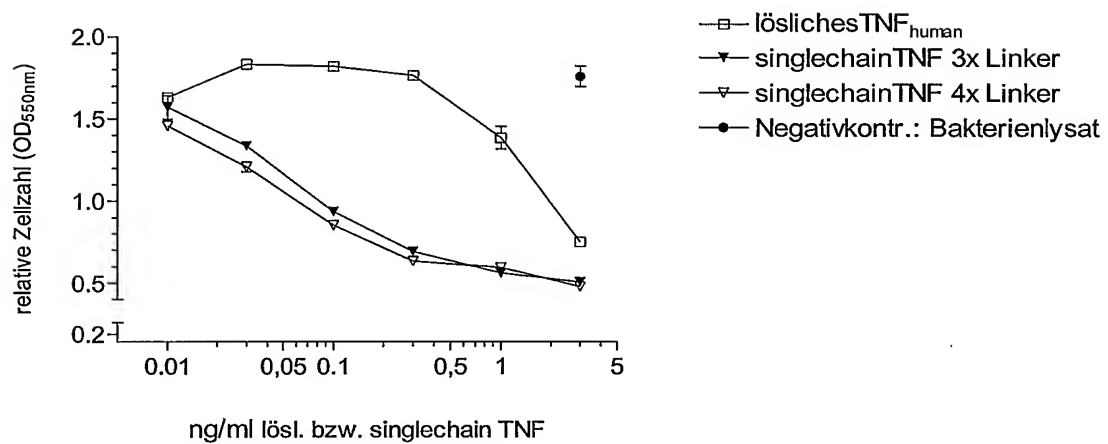
Stabilitätstest mit MF – frisch titriert



Figur 4

5/41

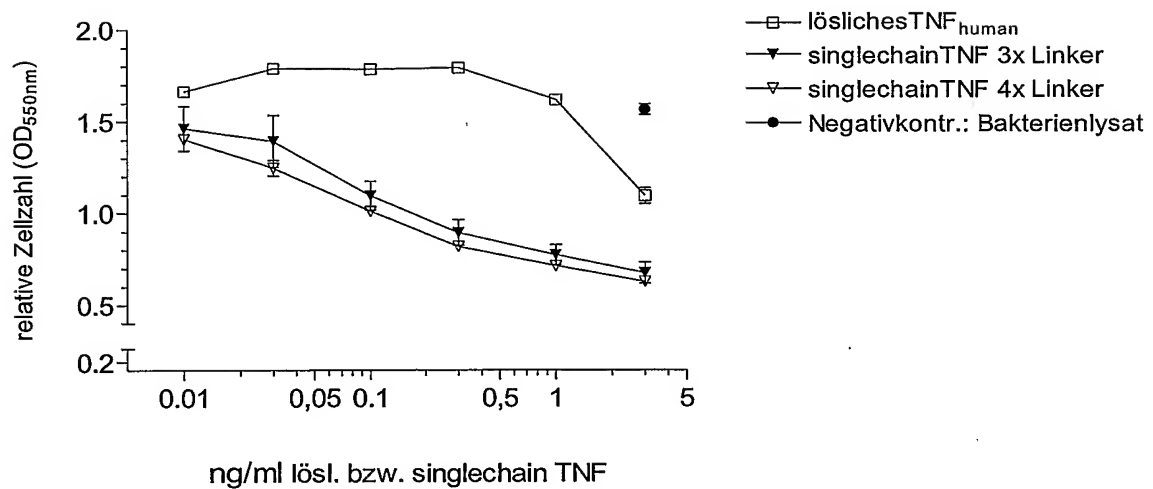
Stabilitätstest mit MF – 8 Tage inkubiert



Figur 5

6/41

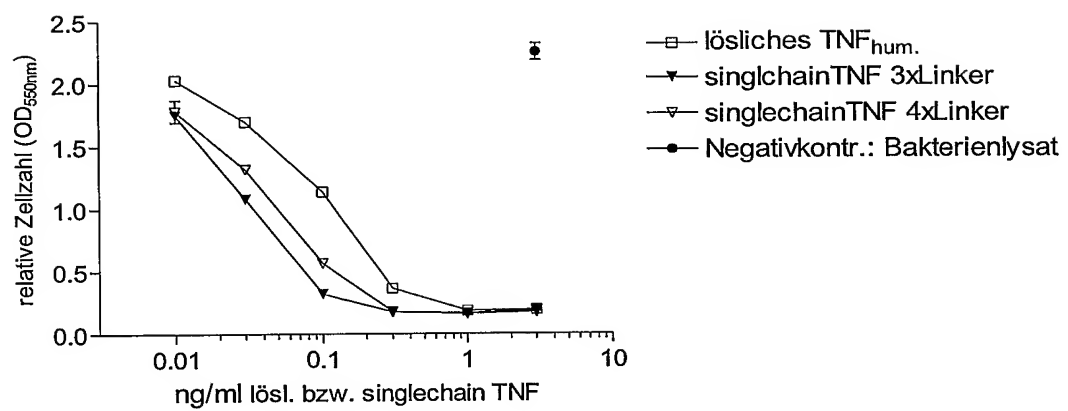
Stabilitätstest mit MF – 14 Tage inkubiert



Figur 6

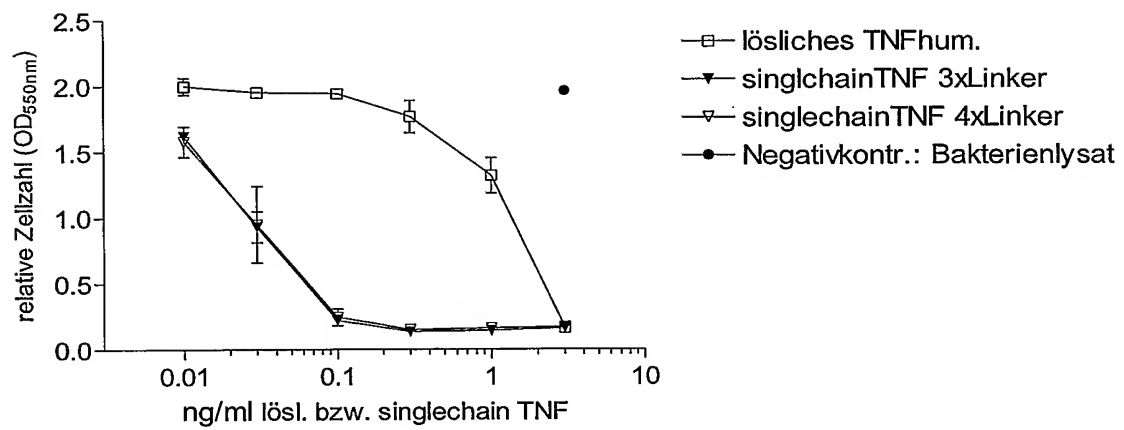
7/41

Stabilitätstest mit Kym1 – frisch titriert

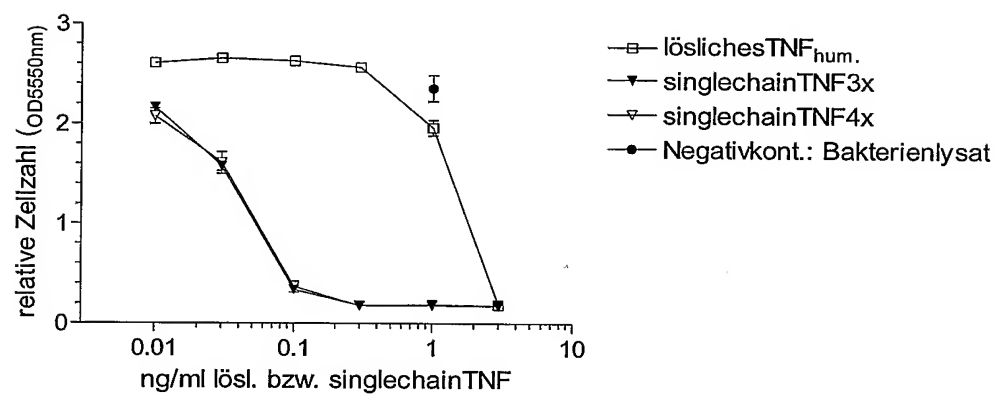


Figur 7

8/41

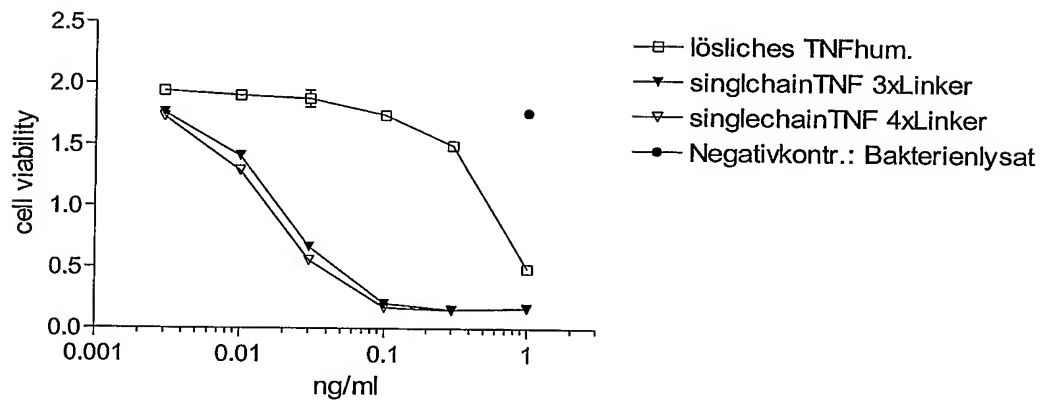
Stabilitätstest mit Kym1 – 16 Tage inkubiert**Figur 8**

9/41

Stabilitätstest mit Kym1 – 22 Tage inkubiert**Figur 9**

10/41

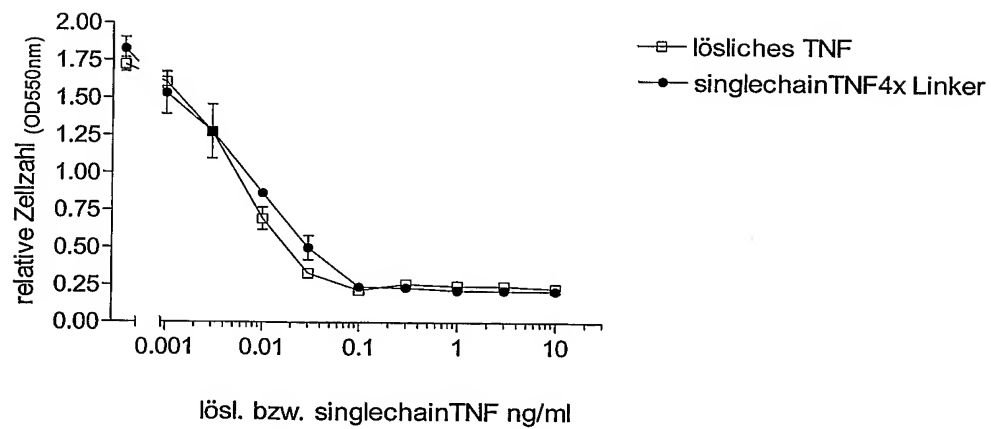
Stabilitätstest mit Kym1 – aus Stammlösung titriert



Figur 10

11/41

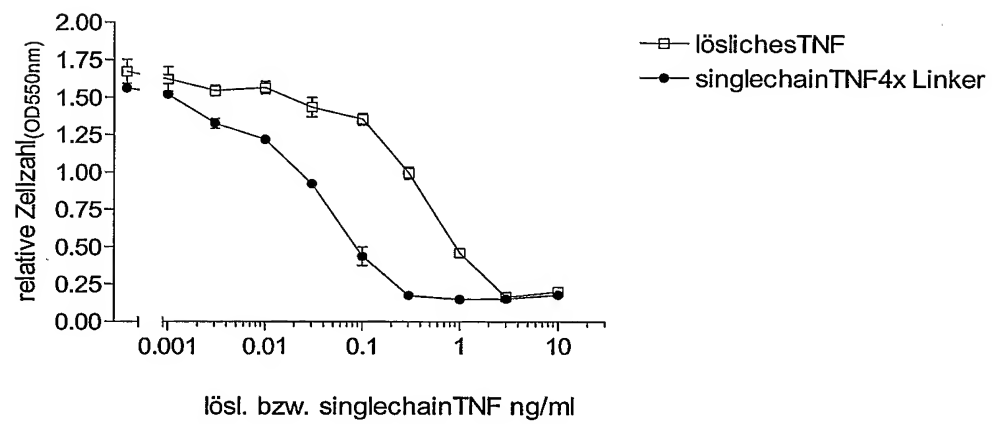
Stabilitätstest mit humanem Serum
Serumstabilität – frisch titriert



Figur 11

12/41

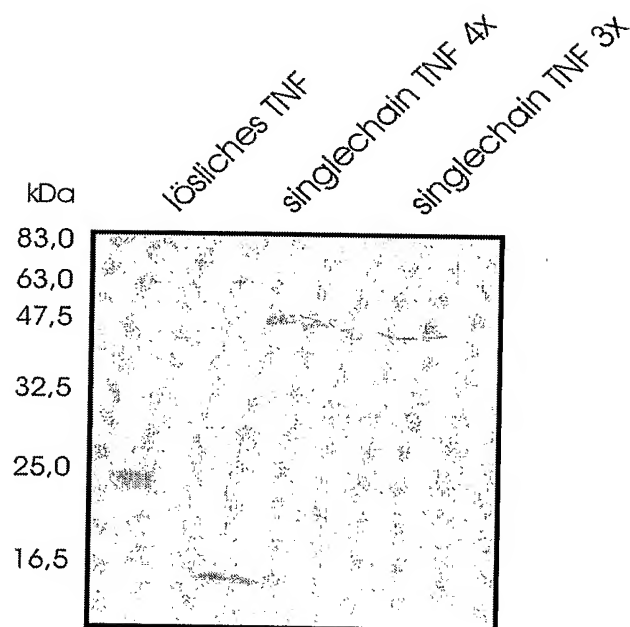
Stabilitätstest mit humanem Serum Serumstabilität – 8 Tage



Figur 12

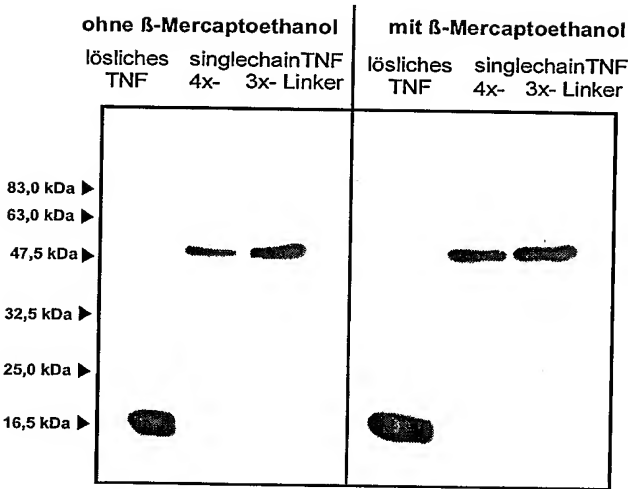
13/41

Silbergel



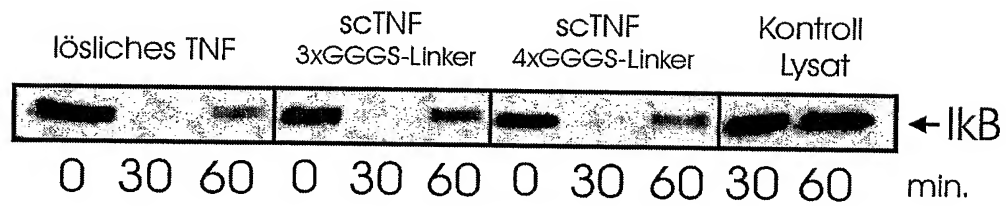
Figur 13

Western Blot

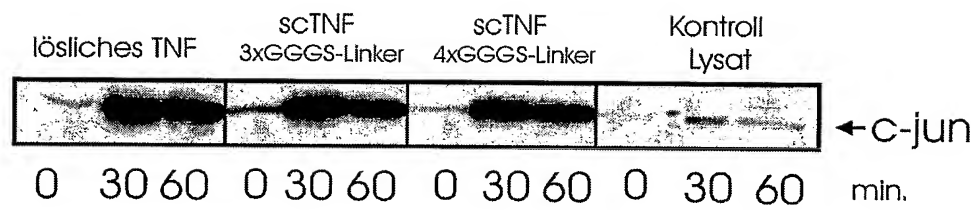


Figur 14

15/41

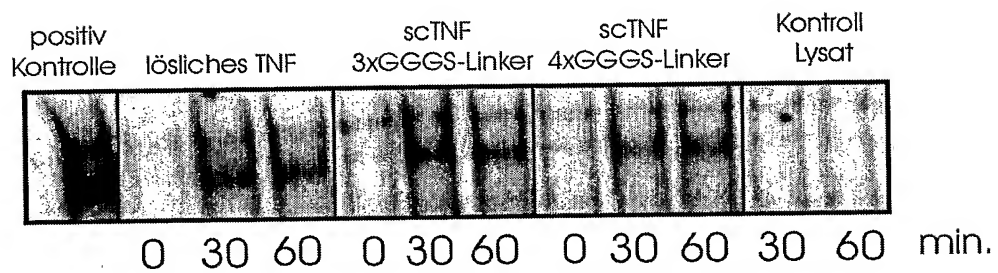
I κ B-Degradations-Assay**Figur 15**

16/41

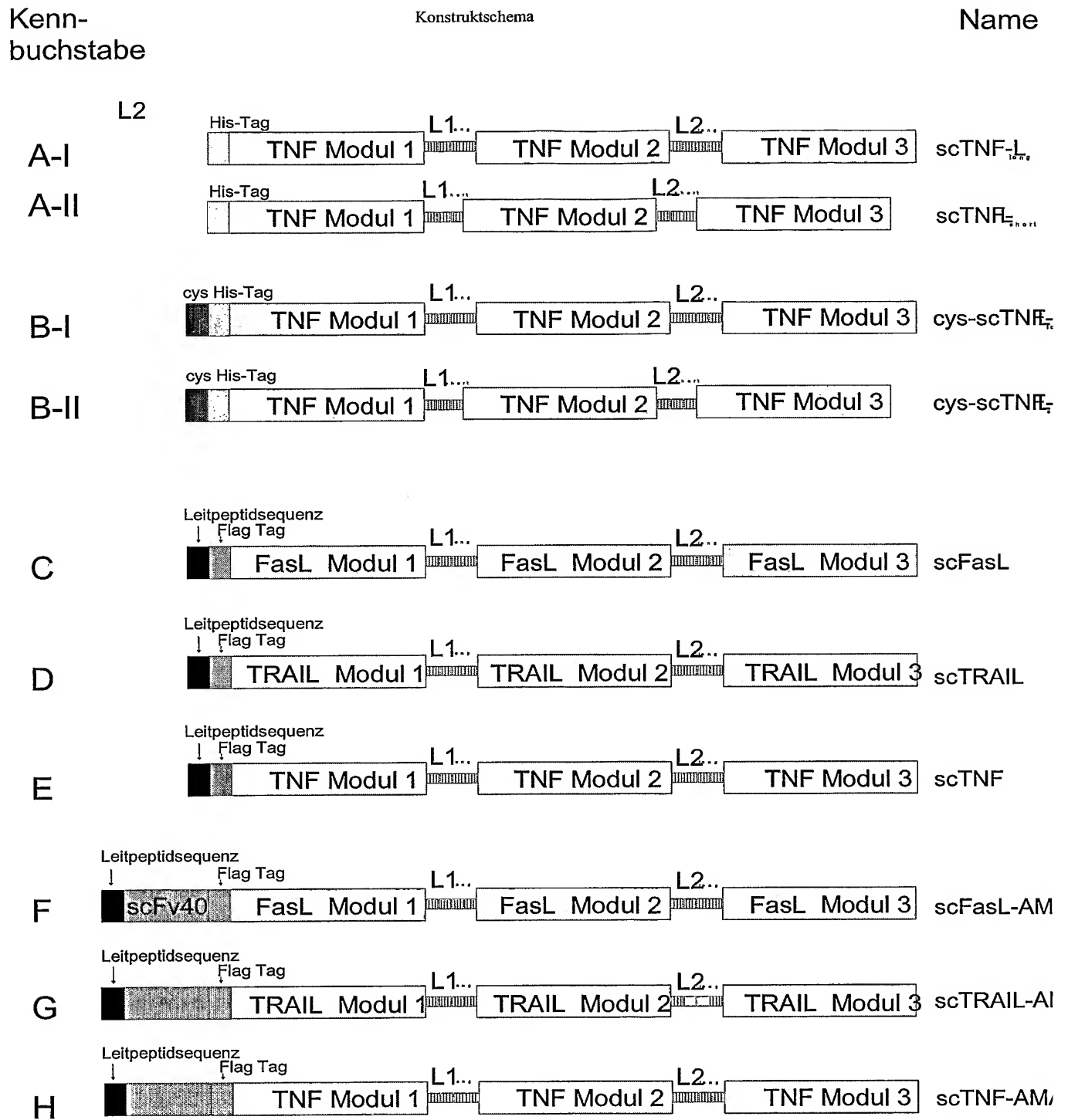
JNK-Assay**Figur 16**

17/41

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

**Figur 17**

18/41



Figur 18

19/41
Figur 19

**Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF-L_{short}
Konstrukt A-II**

1	ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCA	GCG	TCG	TCT	45
1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	A	S	S	15
46	TCT	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	GCA	90
16	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	30
91	AAC	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	GCT	135
31	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	45
136	AAC	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	CTG	180
46	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	60
181	GTT	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	CTG	225
61	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	75
226	TTC	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	CAC	270
76	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	90
271	ACC	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	CTG	315
91	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	105
316	CTG	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	GGT	360
106	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	120
361	GCT	GAA	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	GTT	405
121	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	135
406	TTT	CAA	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	CGT	450
136	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	150
451	CCG	GAC	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	TTC	GGT	495
151	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	165
496	ATC	ATC	GCT	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	540
166	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	180
541	TCC	TCT	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	585
181	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	195
586	GCA	AAC	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	630
196	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	210
631	GCT	AAC	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	675
211	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	225
676	CTG	GTT	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	720
226	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	240
721	CTG	TTC	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	765
241	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	255
766	CAC	ACC	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	810
256	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	270
811	CTG	CTG	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	855
271	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	285

Fortsetzung Figur 19

[illegible]

21/41
Figur 20

**Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von
cys- scTNF-L_{short}
Konstrukt B-II**

1	ATG	GGA	GAG	CTC	ATC	GAA	GGT	CGC	TGC	GCC	GGT	GGA	TCT	GGT	CAT	45
1	M	G	E	L	I	E	G	R	C	A	G	G	S	G	H	15
46	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	GGC	TCA	GAC	GGA	GCG	TCG	TCT	TCT	TCT	CGT	90
16	H	H	H	H	H	G	S	D	G	A	S	S	S	S	R	30
91	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	GCA	AAC	CCG	CAG	135
31	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	Q	45
136	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	GCT	AAC	GCT	CTG	180
46	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	L	60
181	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	CTG	GTT	GTT	CCG	225
61	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	75
226	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	CTG	TTC	AAA	GGC	270
76	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	90
271	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	CAC	ACC	ATC	TCT	315
91	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	105
316	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	CTG	CTG	TCT	GCA	360
106	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	120
361	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	GGT	GCT	GAA	GCT	405
121	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	135
406	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	GTT	TTT	CAA	CTG	450
136	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	Q	L	150
451	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	CGT	CCG	GAC	TAC	495
151	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D	Y	165
496	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CaG	GTT	TAC	TTC	GGT	ATC	ATC	GCT	540
166	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	I	A	180
541	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCC	TCT	TCT	585
181	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	S	S	195
586	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	GCA	AAC	CCG	630
196	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	210
631	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	GCT	AAC	GCT	675
211	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	225
676	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	CTG	GTT	GTT	720
226	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	240
721	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	CTG	TTC	AAA	765
241	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	255
766	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	CAC	ACC	ATC	810
256	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	270

Fortsetzung Figur 20

[illegible]

23/41
Figur 21

**Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scFasL
Konstrukt C**

1	ATG	GCT	ATC	ATC	TAC	CTC	ATC	CTC	CTG	TTC	ACC	GCT	GTG	CGG	GGC	45
1	M	A	I	I	Y	L	I	L	L	F	T	A	V	R	G	15
46	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	ACG	CGT	90
16	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	T	R	30
91	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	135
31	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	S	45
136	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	180
46	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	60
181	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	225
61	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	75
226	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	270
76	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	90
271	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	315
91	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	105
316	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	360
106	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	120
361	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	405
121	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	135
406	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	450
136	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	150
451	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	495
151	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	165
496	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	540
166	T	F	F	G	L	Y	K	L	G	G	G	S	G	G	G	180
541	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	585
181	S	G	G	G	S	G	G	G	S	E	K	K	E	L	R	195
586	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	630
196	K	V	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	210
631	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	675
211	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	225
676	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	720
226	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	240
721	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	765
241	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	255

24/41

Fortsetzung Figur 21

766	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	810
256	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	270
811	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	855
271	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	285
856	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	900
286	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	300
901	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	945
301	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	315
946	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	990
316	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	330
991	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1035
331	K	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	345
1036	GGC	GGA	TCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	1080
346	G	G	S	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	360
1081	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	1125
361	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	375
1126	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	1170
376	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	390
1171	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	1215
391	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	405
1216	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	1260
406	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	420
1261	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	1305
421	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	435
1306	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	1350
436	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	450
1351	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	1395
451	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	465
1396	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	1440
466	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	480
1441	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TGA				1476
481	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	*				491

25/41
Figur 22

**Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scTRAIL
Konstrukt D**

1	ATG	GCT	ATC	ATC	TAC	CTC	ATC	CTC	CTG	TTC	ACC	GCT	GTG	CGG	GGC	45
1	M	A	I	I	Y	L	I	L	L	F	T	A	V	R	G	15
46	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	GGA	ACC	90
16	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	G	T	30
91	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	135
31	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	45
136	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	180
46	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	H	60
181	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	225
61	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	N	75
226	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	270
76	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	E	90
271	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	315
91	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	R	105
316	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	360
106	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	120
361	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	405
121	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	T	135
406	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	450
136	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	150
451	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	495
151	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	R	N	S	C	165
496	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	540
166	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	180
541	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	585
181	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	V	195
586	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	630
196	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	E	A	S	F	F	210
631	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	675
211	G	A	F	L	V	G	G	G	G	S	G	G	G	S	G	225
676	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	720
226	G	G	S	G	G	G	S	T	S	E	E	T	I	S	T	240
721	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	765
241	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	255

26/41

Fortsetzung Figur 22

766	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	810
256	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	270
811	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	855
271	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	285
856	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	900
286	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	300
901	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	945
301	F	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	315
946	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	990
316	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	330
991	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	1035
331	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	345
1036	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	1080
346	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	360
1081	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	1125
361	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	375
1126	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	1170
376	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	390
1171	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	1215
391	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	405
1216	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	GGT	1260
406	M	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	G	420
1261	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCC	1305
421	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	435
1306	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	1350
436	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	450
1351	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	1395
451	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	465
1396	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	1440
466	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	480
1441	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	1485
481	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	495
1486	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	1530
496	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	510
1531	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	1575
511	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	525
1576	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	1620
526	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	540

28/41
Figur 23

Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF

Konstrukt E

1	ATG	GCT	ATC	ATC	TAC	CTC	ATC	CTC	CTG	TTC	ACC	GCT	GTG	CGG	GGC	45
1	M	A	I	I	Y	L	I	L	L	F	T	A	V	R	G	15
46	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	GGA	TCA	90
16	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	G	S	30
91	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	GCA	135
31	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	45
136	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	GCC	180
46	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	60
181	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	CTG	225
61	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	75
226	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	270
76	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	90
271	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	315
91	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	105
316	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	CTC	360
106	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	120
361	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	GGG	405
121	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	135
406	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	GTC	450
136	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	150
451	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	CGG	495
151	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	165
496	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	540
166	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	180
541	ATC	ATT	GCC	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	585
181	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	195
586	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	630
196	S	G	G	G	S	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	210
631	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	675
211	V	A	H	V	V	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	225
676	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	720
226	W	L	N	R	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	240
721	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	765
241	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	255

Fortsetzung Figur 23

[illegible]

30/41

Figur 24

Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scFasL-AMAIZe

Konstrukt F

1	ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	CGC	GTG	TTT	TGC	CTG	CTC	GCC	GTG	GCT	CCT	45
1	M	D	W	T	W	R	V	F	C	L	L	A	V	A	P	15
46	GGG	GCC	CAC	AGC	CAG	GTA	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	ATG	90
16	G	A	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	M	30
91	GTA	GAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTT	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	135
31	V	E	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	45
136	TTC	ACT	TTC	AGT	AAT	GCC	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	180
46	F	T	F	S	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	60
181	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT	ATA	AAA	AGC	AAA	GCT	GGT	225
61	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K	A	G	75
226	GGT	GGG	ACA	GCA	GAG	TAC	GCT	GCA	CCC	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	270
76	G	G	T	A	E	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	90
271	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	CAA	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	315
91	I	S	R	D	D	S	Q	N	T	L	Y	L	Q	M	N	105
316	AGC	CTG	AAA	ACC	GAC	GAC	ACA	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	ACC	ACA	CAT	360
106	S	L	K	T	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	H	120
361	GTC	TAC	GGT	GCC	CCC	CGG	AAC	TGG	GGC	CAG	GGA	TCC	CTG	GTC	ACC	405
121	V	Y	G	A	P	R	N	W	G	Q	G	S	L	V	T	135
406	GTC	TCC	TCA	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	AAG	CTT	GAA	GAA	GGT	GAA	450
136	V	S	S	A	S	T	K	G	P	K	L	E	E	G	E	150
451	TTT	TCA	GAA	GCA	CGC	GTA	CAG	TCT	GTG	TTG	ACT	CAG	CCG	CCC	TCA	495
151	F	S	E	A	R	V	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	165
496	GTG	TCT	GCG	GCC	CCA	GGA	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	TCT	GGA	540
166	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	180
541	AGC	AGC	TCC	AAC	ATT	GGA	AAT	AAT	TAT	GTC	TCC	TGG	TAC	GTT	CAA	585
181	S	S	S	N	I	G	N	N	Y	V	S	W	Y	V	Q	195
586	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATT	TAT	GAC	AAT	AAT	AAG	630
196	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	N	K	210
631	CGA	TTC	TCA	GGA	GTT	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	675
211	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	225
676	ACG	TCA	GCC	ACC	CTG	GGC	ATC	ACC	GGG	CTC	CAG	ACT	GGG	GAC	GAG	720
226	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	240
721	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC	GGA	GCA	TGG	GAT	GGC	AGC	CTG	CGT	GAA	GCG	765
241	A	D	Y	Y	C	G	A	W	D	G	S	L	R	E	A	255

31/41

Fortsetzung Figur 24

766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	gcg	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	ACG	CGT	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	900
286	E	F	T	R	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	300
901	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	945
301	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	315
946	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	990
316	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	330
991	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	1035
331	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	345
1036	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	1080
346	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	360
1081	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	1125
361	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	375
1126	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	1170
376	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	390
1171	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	1215
391	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	405
1216	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	1260
406	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	420
1261	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	1305
421	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	G	G	G	435
1306	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	GAA	AAA	1350
436	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	E	K	450
1351	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	1395
451	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	S	N	S	465
1396	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	1440
466	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	480
1441	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	1485
481	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	E	495
1486	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	1530
496	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	510
1531	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	1575
511	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	525
1576	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	1620
526	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	540

32/41

Fortsetzung Figur 24

[illegible]

33/41 Figur 25

Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scTRAIL-AMAIZE
Konstrukt G

1	ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	CGC	GTG	TTT	TGC	CTG	CTC	GCC	GTG	GCT	CCT	45
1	M	D	W	T	W	R	V	F	C	L	L	A	V	A	P	15
46	GGG	GCC	CAC	AGC	CAG	GTA	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	ATG	90
16	G	A	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	M	30
91	GTA	GAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTT	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	135
31	V	E	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	45
136	TTC	ACT	TTC	AGT	AAT	GCC	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	180
46	F	T	F	S	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	60
181	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT	ATA	AAA	AGC	AAA	GCT	GGT	225
61	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K	A	G	75
226	GGT	GGG	ACA	GCA	GAG	TAC	GCT	GCA	CCC	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	270
76	G	G	T	A	E	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	90
271	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	CAA	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	315
91	I	S	R	D	D	S	Q	N	T	L	Y	L	Q	M	N	105
316	AGC	CTG	AAA	ACC	GAC	GAC	ACA	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	ACC	ACA	CAT	360
106	S	L	K	T	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	H	120
361	GTC	TAC	GGT	GCC	CCC	CGG	AAC	TGG	GGC	CAG	GGA	TCC	CTG	GTC	ACC	405
121	V	Y	G	A	P	R	N	W	G	Q	G	S	L	V	T	135
406	GTC	TCC	TCA	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	AAG	CTT	GAA	GAA	GGT	GAA	450
136	V	S	S	A	S	T	K	G	P	K	L	E	E	G	E	150
451	TTT	TCA	GAA	GCA	CGC	GTA	CAG	TCT	GTG	TTG	ACT	CAG	CCG	CCC	TCA	495
151	F	S	E	A	R	V	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	165
496	GTG	TCT	GCG	GCC	CCA	GGA	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	TCT	GGA	540
166	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	180
541	AGC	AGC	TCC	AAC	ATT	GGA	AAT	AAT	TAT	GTC	TCC	TGG	TAC	GTT	CAA	585
181	S	S	S	N	I	G	N	N	Y	V	S	W	Y	V	Q	195
586	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATT	TAT	GAC	AAT	AAT	AAG	630
196	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	N	K	210
631	CGA	TTC	TCA	GGA	GTT	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	675
211	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	225
676	ACG	TCA	GCC	ACC	CTG	GGC	ATC	ACC	GGG	CTC	CAG	ACT	GGG	GAC	GAG	720
226	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	240

34/41

Fortsetzung Figur 25

721	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC	GGA	GCA	TGG	GAT	GGC	AGC	CTG	CGT	GAA	GCG	765
241	A	D	Y	Y	C	G	A	W	D	G	S	L	R	E	A	255
766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	GGA	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	900
286	E	F	G	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	300
901	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	945
301	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	315
946	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	990
316	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	330
991	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	1035
331	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	345
1036	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	1080
346	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	360
1081	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	1125
361	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	375
1126	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	1170
376	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	390
1171	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	1215
391	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	405
1216	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	1260
406	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	420
1261	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	1305
421	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	435
1306	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	1350
436	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	450
1351	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	1395
451	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	E	465
1396	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1440
466	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	G	G	G	S	G	480
1441	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	ACC	TCT	GAG	GAA	1485
481	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	T	S	E	E	495
1486	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	1530
496	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	S	P	L	510
1531	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	1575
511	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	525

35/41

Fortsetzung Figur 25

1576	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	1620
526	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	540
1621	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	1665
541	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	555
1666	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	1710
556	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	570
1711	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	1755
571	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	585
1756	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	1800
586	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	N	D	600
1801	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	1845
601	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	615
1846	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	1890
616	P	I	L	L	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	630
1891	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	1935
631	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	645
1936	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	1980
646	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	660
1981	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	2025
661	H	L	I	D	M	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	675
2026	TTA	GTT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	2070
676	L	V	G	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	690
2071	GGT	GGC	GGA	TCC	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	2115
691	G	G	G	S	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	705
2116	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	2160
706	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	720
2161	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	2205
721	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	735
2206	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	2250
736	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	750
2251	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	2295
751	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	765
2296	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	2340
766	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	780
2341	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	2385
781	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	795
2386	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	2430
796	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	810

36/41

Fortsetzung Figur 25

2431	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	2475
811	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	825
2476	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	2520
826	A	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	840
2521	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	2565
841	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	855
2566	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	2610
856	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	870
2611	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	TGA				2646
871	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	*				881

37/41
Figur 26

**Nukleinsäuresequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz von scTNF-
AMAIZe**

Konstrukt H

1	ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	CGC	GTG	TTT	TGC	CTG	CTC	GCC	GTG	GCT	CCT	45
1	M	D	W	T	W	R	V	F	C	L	L	A	V	A	P	15
46	GGG	GCC	CAC	AGC	CAG	GTA	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	ATG	90
16	G	A	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	M	30
91	GTA	GAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTT	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	135
31	V	E	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	45
136	TTC	ACT	TTC	AGT	AAT	GCC	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	180
46	F	T	F	S	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	60
181	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT	ATA	AAA	AGC	AAA	GCT	GGT	225
61	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	K	S	K	A	G	75
226	GGT	GGG	ACA	GCA	GAG	TAC	GCT	GCA	CCC	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	270
76	G	G	T	A	E	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	90
271	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	CAA	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	315
91	I	S	R	D	D	S	Q	N	T	L	Y	L	Q	M	N	105
316	AGC	CTG	AAA	ACC	GAC	GAC	ACA	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	ACC	ACA	CAT	360
106	S	L	K	T	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	H	120
361	GTC	TAC	GGT	GCC	CCC	CGG	AAC	TGG	GGC	CAG	GGA	TCC	CTG	GTC	ACC	405
121	V	Y	G	A	P	R	N	W	G	Q	G	S	L	V	T	135
406	GTC	TCC	TCA	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	AAG	CTT	GAA	GAA	GGT	GAA	450
136	V	S	S	A	S	T	K	G	P	K	L	E	E	G	E	150
451	TTT	TCA	GAA	GCA	CGC	GTA	CAG	TCT	GTG	TTG	ACT	CAG	CCG	CCC	TCA	495
151	F	S	E	A	R	V	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	165
496	GTG	TCT	GCG	GCC	CCA	GGA	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	TCT	GGA	540
166	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	180
541	AGC	AGC	TCC	AAC	ATT	GGA	AAT	AAT	TAT	GTC	TCC	TGG	TAC	GTT	CAA	585
181	S	S	S	N	I	G	N	N	Y	V	S	W	Y	V	Q	195
586	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATT	TAT	GAC	AAT	AAT	AAG	630
196	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	N	K	210
631	CGA	TTC	TCA	GGA	GTT	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	675
211	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	225
676	ACG	TCA	GCC	ACC	CTG	GGC	ATC	ACC	GGG	CTC	CAG	ACT	GGG	GAC	GAG	720
226	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	240
721	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC	GGA	GCA	TGG	GAT	GGC	AGC	CTG	CGT	GAA	GCG	765
241	A	D	Y	Y	C	G	A	W	D	G	S	L	R	E	A	255

38/41

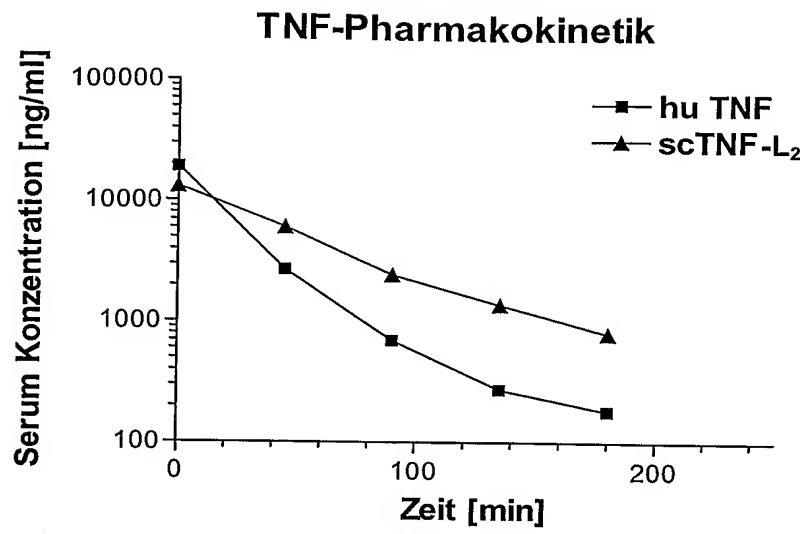
Fortsetzung Figur 26

766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	GGA	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	900
286	E	F	G	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	300
901	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	945
301	H	V	V	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	315
946	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	990
316	N	R	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	330
991	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	1035
331	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	345
1036	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	1080
346	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	360
1081	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	1125
361	L	L	T	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	375
1126	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	1170
376	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	390
1171	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	1215
391	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	405
1216	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	1260
406	L	G	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	420
1261	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	1305
421	E	I	N	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	435
1306	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	1350
436	V	Y	F	G	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	450
1351	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	1395
451	S	G	G	G	S	G	G	G	S	S	S	S	R	T	P	465
1396	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	1440
466	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	Q	A	E	480
1441	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	1485
481	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	L	L	A	495
1486	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	1530
496	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	510
1531	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	1575
511	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	525
1576	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	1620
526	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	I	540

Fortsetzung Figur 26

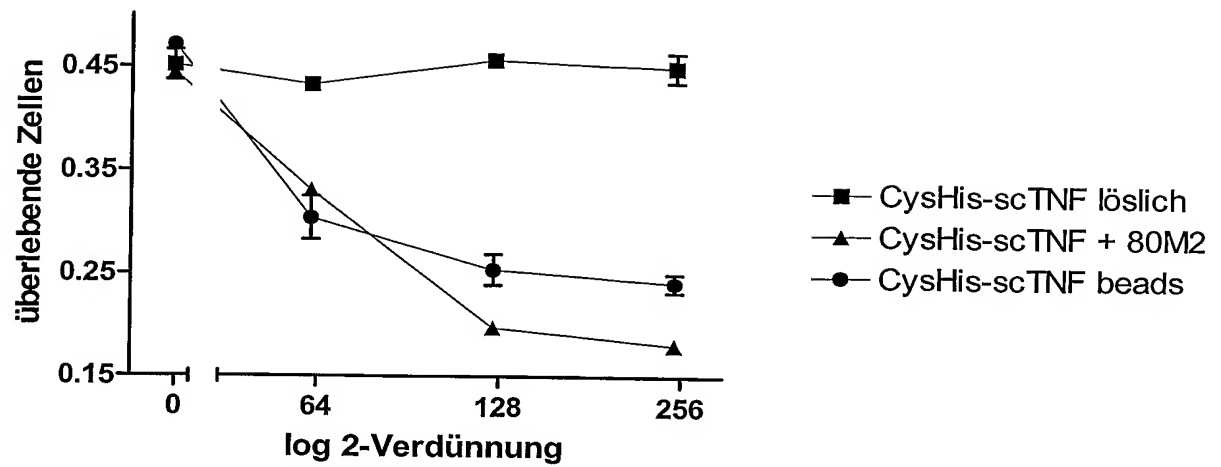
[illegible]

40/41



Figur 27

41/41



Figur 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/003158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/525 C12N15/62 C12N15/63 A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/25277 A (MAXYGEN APS) 12 April 2001 (2001-04-12)	1-5, 7-11, 19-27
Y	abstract page 12, line 16 - page 13, line 22 page 26, line 16 - page 28, line 15 page 34 - page 48 page 56 - page 66; figures 1-4; examples 1,2	6,12-18, 28-30
X	WO 03/042244 A (PHARMEXA A/S; KLYSNER, STEEN; NIELSEN, FINN, STAUSHOLM; BRATT, TOMAS;) 22 May 2003 (2003-05-22) abstract page 37, line 23 - page 41, line 7 page 46, line 18 - page 47, line 4 example 8	1-5, 7-11, 19-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2005

Date of mailing of the international search report

08/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/003158

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/003158

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/099244 A (PHARMEXA A/S; BRATT, TOMAS; KLYSNER, STEEN; NIELSEN, FINN; MOURITSEN,) 18 November 2004 (2004-11-18) abstract; claim 1	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 19-27
Y	WO 02/22680 A (PFIZENMAIER, KLAUS; WAJANT, HARALD; MOOSMAYER, DIETER; WUEEST, THOMAS) 21 March 2002 (2002-03-21) cited in the application abstract page 16, line 20 - page 18, line 13; figure 3; examples 1, 2	6, 12-18, 28-30
Y	WO 02/077018 A (IBA GMBH; SCHMIDT, THOMAS) 3 October 2002 (2002-10-03) abstract page 28, line 11	6
A	WO 01/49866 A (APOTECH RESEARCH AND DEVELOPMENT LTD; TSCHOPP, JUERG; SCHNEIDER, PASCA) 12 July 2001 (2001-07-12)	
A	WO 02/00893 A (CANCER RESEARCH VENTURES LIMITED; AL-SHAMKHANI, AYMEN; GLENNIE, MARTIN) 3 January 2002 (2002-01-03)	

Continuation of Box II.1

Although claims 25, 29 and 30 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/003158

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0125277	A	12-04-2001	AU 7645700 A WO 0125277 A1 EP 1226173 A1 US 2004014948 A1	10-05-2001 12-04-2001 31-07-2002 22-01-2004
WO 03042244	A	22-05-2003	CA 2467052 A1 CN 1615316 A WO 03042244 A2 EP 1448598 A2 HU 0402155 A2 JP 2005518194 T US 2003185845 A1 US 2004258660 A1	22-05-2003 11-05-2005 22-05-2003 25-08-2004 28-01-2005 23-06-2005 02-10-2003 23-12-2004
WO 2004099244	A	18-11-2004	WO 2004099244 A2	18-11-2004
WO 0222680	A	21-03-2002	DE 10045591 A1 AU 1816302 A WO 0222680 A2 EP 1317488 A2 JP 2004508819 T US 2004033511 A1	04-04-2002 26-03-2002 21-03-2002 11-06-2003 25-03-2004 19-02-2004
WO 02077018	A	03-10-2002	DE 10113776 A1 WO 02077018 A1 EP 1370574 A1 US 2003083474 A1	02-10-2002 03-10-2002 17-12-2003 01-05-2003
WO 0149866	A	12-07-2001	DE 19963859 A1 AU 2367301 A BR 0017054 A CA 2395632 A1 CN 1526020 A WO 0149866 A1 EP 1246925 A1 HU 0203628 A2 JP 2003518949 T PL 358456 A1 US 2003053984 A1 US 2004235117 A1 ZA 200205069 A	12-07-2001 16-07-2001 07-01-2003 12-07-2001 01-09-2004 12-07-2001 09-10-2002 28-02-2003 17-06-2003 09-08-2004 20-03-2003 25-11-2004 24-03-2004
WO 0200893	A	03-01-2002	AU 6768301 A CA 2414342 A1 EP 1297160 A1 WO 0200893 A1 US 2004047873 A1	08-01-2002 03-01-2002 02-04-2003 03-01-2002 11-03-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003158

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/525 C12N15/62 C12N15/63 A61K38/19		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/25277 A (MAXYGEN APS) 12. April 2001 (2001-04-12)	1-5, 7-11, 19-27
Y	Zusammenfassung Seite 12, Zeile 16 - Seite 13, Zeile 22 Seite 26, Zeile 16 - Seite 28, Zeile 15 Seite 34 - Seite 48 Seite 56 - Seite 66; Abbildungen 1-4; Beispiele 1,2	6,12-18, 28-30
X	WO 03/042244 A (PHARMEXA A/S; KLYSNER, STEEN; NIELSEN, FINN, STAUSHOLM; BRATT, TOMAS;) 22. Mai 2003 (2003-05-22) Zusammenfassung Seite 37, Zeile 23 - Seite 41, Zeile 7 Seite 46, Zeile 18 - Seite 47, Zeile 4 Beispiel 8	1-5, 7-11, 19-27
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 31. August 2005		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08/09/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Mossier, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003158

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 2004/099244 A (PHARMEXA A/S; BRATT, TOMAS; KLYSNER, STEEN; NIELSEN, FINN; MOURITSEN,) 18. November 2004 (2004-11-18) Zusammenfassung; Anspruch 1	1,2,4,5, 7,9,10, 19-27
Y	WO 02/22680 A (PFIZENMAIER, KLAUS; WAJANT, HARALD; MOOSMAYER, DIETER; WUEEST, THOMAS) 21. März 2002 (2002-03-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 16, Zeile 20 - Seite 18, Zeile 13; Abbildung 3; Beispiele 1,2	6,12-18, 28-30
Y	WO 02/077018 A (IBA GMBH; SCHMIDT, THOMAS) 3. Oktober 2002 (2002-10-03) Zusammenfassung Seite 28, Zeile 11	6
A	WO 01/49866 A (APOTECH RESEARCH AND DEVELOPMENT LTD; TSCHOPP, JUERG; SCHNEIDER, PASCA) 12. Juli 2001 (2001-07-12)	
A	WO 02/00893 A (CANCER RESEARCH VENTURES LIMITED; AL-SHAMKHANI, AYMEN; GLENNIE, MARTIN) 3. Januar 2002 (2002-01-03)	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/003158

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 25, 29 und 30 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003158

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0125277 A	12-04-2001	AU 7645700 A	10-05-2001
		WO 0125277 A1	12-04-2001
		EP 1226173 A1	31-07-2002
		US 2004014948 A1	22-01-2004
WO 03042244 A	22-05-2003	CA 2467052 A1	22-05-2003
		CN 1615316 A	11-05-2005
		WO 03042244 A2	22-05-2003
		EP 1448598 A2	25-08-2004
		HU 0402155 A2	28-01-2005
		JP 2005518194 T	23-06-2005
		US 2003185845 A1	02-10-2003
		US 2004258660 A1	23-12-2004
WO 2004099244 A	18-11-2004	WO 2004099244 A2	18-11-2004
WO 0222680 A	21-03-2002	DE 10045591 A1	04-04-2002
		AU 1816302 A	26-03-2002
		WO 0222680 A2	21-03-2002
		EP 1317488 A2	11-06-2003
		JP 2004508819 T	25-03-2004
		US 2004033511 A1	19-02-2004
WO 02077018 A	03-10-2002	DE 10113776 A1	02-10-2002
		WO 02077018 A1	03-10-2002
		EP 1370574 A1	17-12-2003
		US 2003083474 A1	01-05-2003
WO 0149866 A	12-07-2001	DE 19963859 A1	12-07-2001
		AU 2367301 A	16-07-2001
		BR 0017054 A	07-01-2003
		CA 2395632 A1	12-07-2001
		CN 1526020 A	01-09-2004
		WO 0149866 A1	12-07-2001
		EP 1246925 A1	09-10-2002
		HU 0203628 A2	28-02-2003
		JP 2003518949 T	17-06-2003
		PL 358456 A1	09-08-2004
		US 2003053984 A1	20-03-2003
		US 2004235117 A1	25-11-2004
		ZA 200205069 A	24-03-2004
WO 0200893 A	03-01-2002	AU 6768301 A	08-01-2002
		CA 2414342 A1	03-01-2002
		EP 1297160 A1	02-04-2003
		WO 0200893 A1	03-01-2002
		US 2004047873 A1	11-03-2004